

**Bedeutung der Aminosäureposition 222 im
Hämagglutinin für die Pathogenität und
Neuraminidaseinhibitor-Empfindlichkeit von
H1N1 Influenza-A-Viren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Nora Seidel
geboren am 01. November 1987 in Lichtenstein

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. habil. Michaela Schmidtke
Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. habil. Peter Wutzler
Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Dr. med. vet. habil. Thomas W. Vahlenkamp
Institut für Virologie, Universität Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. Juni 2015

Abkürzungsverzeichnis

A(H1N1)pdm09	pandemisches Influenza-A-Virus vom Subtyp H1N1, Auslöser der Influenzapandemie von 2009/10
AS	Aminosäure
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	Tag
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	fetales Kälberserum
H1-18	Hämagglutinin-Subtyp 1 - 18
HA	Hämagglutinin
HA1/HA2	Untereinheit 1/2 des Hämagglutinins
HA-222	Aminosäureposition 222 des Hämagglutinins
HA-D222	Asparaginsäure an der Aminosäureposition 222 des Hämagglutinins
HA-D222G	Substitution der Aminosäureposition 222 des Hämagglutinins von Asparaginsäure zu Glycin
HA-G222	Glycin an der Aminosäureposition 222 des Hämagglutinins
HPAIV	<i>highly pathogenic avian influenza viruses</i> , hochpathogene, aviäre Influenzaviren
IAV	Influenza-A-Viren
IC ₅₀	<i>50% inhibitory concentration</i> , 50%ige Hemmkonzentration
LPAIV	<i>low pathogenic avian influenza viruses</i> , niedrigpathogene, aviäre Influenzaviren
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MAA	<i>Maackia amurensis</i> -Agglutinin
MDBK	<i>Madine Darby Bovine Kidney</i> , Rindernierenzellen
MDCK	<i>Madine Darby Canine Kidney</i> , Hundenierenzellen
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
N1-11	Neuraminidase-Subtyp 1 - 11

Abkürzungsverzeichnis

NA	Neuraminidase
NAI	Neuraminidase-Inhibitor
NP	Nukleoprotein
NS1	Nicht-Struktur-Protein 1
NS2/NEP	Nicht-Struktur-Protein 2/Nuklear-Export-Protein
PA	Polymerase-Acid-Protein
PB1	Polymerase-Basic-Protein 1
PB2	Polymerase-Basic-Protein 2
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
p. i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
SA α 2,3Gal	Sialinsäure über eine α 2,3-Bindung an Galaktose geknüpft
SA α 2,6Gal	Sialinsäure über eine α 2,6-Bindung an Galaktose geknüpft
TCID ₅₀	<i>50% tissue culture infectious dose</i> , 50%ige Infektionsdosis in Zellen
zpE	zytopathischer Effekt

Aminosäuren:

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
D	Asparaginsäure	F	Phenylalanin
C	Cystein	P	Prolin
Q	Glutamin	S	Serin
E	Glutaminsäure	T	Threonin
G	Glycin	W	Tryptophan
H	Histidin	Y	Tyrosin
I	Isoleucin	V	Valin

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Systematik, Aufbau und Replikation von Influenza-A-Viren	3
2.2 Struktur und Funktion des viralen Hämagglutinins	7
2.3 Bedeutung des Hämagglutinins für den Tropismus, die Pathogenität und die Epidemiologie von Influenza-A-Viren	11
2.4 Einfluss des Hämagglutinins auf die Prophylaxe und Therapie der Influenza	19
2.5 Zielstellung	27
3 Material und Methoden	29
3.1 Antivirale Substanzen	29
3.2 Chemikalien und Lösungsmittel	29
3.3 Zelllinien und Zellkultivierung	30
3.4 Viren und Virusvermehrung	31
3.5 Virustiterbestimmung	31
3.6 Plaquereinigung	32
3.7 Replikation auf MDBK- und MDCK-Zellen	32
3.8 Methoden zur Bestimmung der NAI-Empfindlichkeit <i>in vitro</i>	33
3.9 Hämagglutinationstest	34
3.10 Lektinfärbung auf MDBK- und MDCK-Zellen	35
3.11 Charakterisierung des Infektionsverlaufs von Influenza-A-Viren und Untersuchung der Wirksamkeit von Oseltamivir-Phosphat und Ribavirin <i>in vivo</i>	36
3.12 Organaufarbeitung zur Virustiterbestimmung	40
3.13 Histologie	41
3.14 Bestimmung der Antikörpertiter	42
3.15 Primer	42
3.16 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	45

3.17 Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	46
3.18 Aufreinigung von PCR-Fragmenten und Sequenzierung.....	47
3.19 Statistische Auswertung	48
4 Ergebnisse	49
4.1 Replikation, Rezeptorbindung und NAI-Empfindlichkeit von H1N1-Viren mit HA-D222 und HA-G222 <i>in vitro</i>	49
4.1.1 Replikation von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 in Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorexpression	49
4.1.2 Hämagglutination unterschiedlicher Erythrozyten durch mpJena/5258 und mpPotsdam/15	51
4.1.3 NAI- und Ribavirin-Empfindlichkeit von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 in MDCK-Zellen	52
4.2 Einfluss von HA-222D/G auf den Infektionsverlaufs von H1N1-Viren <i>in vivo</i>	53
4.2.1 Unterschiede im Verlauf der mpJena/5258- und mpPotsdam/15-Infektion in BALB/c-Mäusen	53
4.2.2 Ein HA-222D/G-Polymorphismus verursacht den unterschiedlichen Infektionsverlauf in mpJena/5258- und mpPotsdam/15-infizierten BALB/c-Mäusen	58
4.3 <i>In vivo</i> -Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin bei Infektion mit einem IAV mit HA-222D/G-Polymorphismus	67
4.4 <i>In vivo</i> -Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin bei Infektionen mit HA-G222-IAV-Varianten.....	73
4.4.1 Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin in mpPotsdam/15-infizierten BALB/c-Mäusen	74
4.4.2 Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin in HA-G222-mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen	81
5 Diskussion	89
5.1 Die Bedeutung der HA-222 für die Evolution und die Pathogenität von H1N1-IAV im Mausmodell.....	89
5.1.1 Der HA-222D/G-Polymorphismus ermöglicht eine schnelle Evolution von A(H1N1)pdm09 in BALB/c-Mäusen.....	89

5.1.2 HA-G222 erhöht die Pathogenität von H1N1-IAV.....	94
5.2 Der Einfluss der HA-222 auf die Wirkung von Oseltamivir.....	102
6 Schlussfolgerungen	114
7 Literaturverzeichnis.....	116
Anhang	136
Abbildungsverzeichnis	136
Tabellenverzeichnis.....	139
Danksagung.....	141
Ehrenwörtliche Erklärung	142
Lebenslauf	143
Wissenschaftliche Beiträge	144

1 Zusammenfassung

Das Hämagglutinin (HA) stellt ein Hauptantigen von Influenza-A-Viren (IAV) dar und ermöglicht die Bindung an α -2,3- und/oder α -2,6-verknüpfte Sialinsäurereste (SA α 2,3Gal, SA α 2,6Gal) auf der Wirtszelloberfläche, die als Rezeptoren für den Viruseintritt in die Zelle dienen. Um eine effiziente Virusausbreitung zu gewährleisten, muss diese HA-Funktion mit der Funktion der viralen Neuraminidase (NA), die Sialinsäurereste als Substrat nutzt und abschneidet, abgestimmt sein. Diese funktionelle NA-HA-Balance beeinflusst auch die Wirkung von NA-Inhibitoren (NAI) *in vitro*. Die Aminosäuresubstitution HA-D222G bzw. ein Polymorphismus der Aminosäure 222 im Hämagglutinin (HA-222) wurden als mögliche Ursache für die unterschiedliche Pathogenität von H1N1-Viren der Pandemie von 2009 (A(H1N1)pdm09) im Mensch und in der Maus kontrovers diskutiert. Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation sollten dazu beitragen, die Bedeutung der HA-222 für die Pathogenität und die NAI-Empfindlichkeit von H1N1 IAV aufzuklären.

Die Analysen wurden exemplarisch mit dem A(H1N1)pdm09-Virus mpJena/5258 und dem porzinen H1N1-Virus mpPotsdam/15 in BALB/c-Mäusen durchgeführt. Sequenzanalysen von Virusisolaten aus der Mauslunge und -trachea belegten für mpJena/5258 einen HA-222D/G-Polymorphismus und für mpPotsdam/15 ein Glycin an der HA-222 (HA-G222). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der HA-222D/G-Polymorphismus mit einer in zwei Phasen verlaufenden Virusreplikation in der Lunge und der Trachea und diese wiederum mit einem biphasischen Krankheitsverlauf in mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen korrelierte. Die späte Phase der Erkrankung am Tag 6 - 8 p. i. zeichnete sich durch eine schwere Symptomatik und einer Änderung im Organotropismus aus. Während die HA-D222-Variante in der Lunge dominierte, überwog die HA-G222-Variante ab Tag 5 p. i. in der Trachea und erreichte sogar höhere Virustiter als in der Lunge. *In vitro*-Experimente mit den Plaque-gereinigten Varianten HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 zeigten, dass ein HA-G222 eine stärkere Bindung an SA α 2,3Gal vermittelt als ein HA-D222 und dadurch die NA-HA-Balance verändert wird. Dies könnte den Selektionsvorteil der HA-G222-Variante in der Mastrachea, die fast ausschließlich SA α 2,3Gal exprimiert, erklären. Zudem wurde die Selektion der HA-G222-Variante durch eine verminderte Erkennung neutralisierender Antikörper begünstigt.

Weitere *In vivo*-Experimente belegten die Assoziation der HA-G222 und der Pathogenität. BALB/c-Mäuse, die mit der Plaque-gereinigten Variante HA-G222-mpJena/5258 infiziert wurden, erkrankten schwerer als mpJena/5258-infizierte Tiere, wobei das Maximum der

Symptomatik an den Tagen 5 - 7 p. i. beobachtet wurde. Die stärkste Pathogenität zeigte das Isolat mpPotsdam/15, welches neben einem HA-G222 noch andere Aminosäuresubstitutionen im HA im Vergleich zu mpJena/5258 besitzt. Es band sehr stark an SA α 2,3Gal und unterschied sich von HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 in der NA-HA-Balance. Gleichzeitig ließ es sich schlechter durch Antikörper neutralisieren.

Obwohl alle untersuchten Viren *in vitro* NAI-sensitiv waren, fiel die Wirkung von Oseltamivir *in vivo* unterschiedlich aus. Es war bereits bekannt, dass die prophylaktische Oseltamivir-Gabe (10 mg/kg/d über fünf Tage, Behandlungsbeginn 4 Stunden vor Infektion) bei mpJena/5258-infizierten (10^6 TCID₅₀) BALB/c-Mäusen nicht wirkte (Seidel 2011). Weder eine niedrigere Infektionsdosis (10^5 TCID₅₀), noch eine erhöhte Oseltamivir-Konzentration (100 mg/kg/d) oder eine verlängerte Behandlung (sieben Tage) führten zu einer Wirkungsverbesserung. Im Unterschied dazu reduzierte das als Kontrolle mitgeführte Nukleosidanalogon Ribavirin signifikant die mpJena/5258-Vermehrung und verhinderte die späte, schwere Phase der Erkrankung.

Bei Mäusen, die mit HA-G222-mpJena/5258 infiziert wurden (10^6 TCID₅₀), wirkte die prophylaktische Behandlung mit 10 mg/kg/d Oseltamivir (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion) und die therapeutische Behandlung mit 100 mg/kg/d Oseltamivir (Behandlungsbeginn zwei Tage nach Infektion) über fünf Tage auf einzelne Parameter. Die prophylaktische Behandlung einer letalen mpPotsdam/15-Infektion (10^4 TCID₅₀) mit 10 mg/kg/d Oseltamivir über fünf Tage (Behandlungsbeginn 4 Stunden vor Infektion) zeigte keine signifikanten Effekte. Die prophylaktische Gabe über fünf und sieben Tage sowie die therapeutische Behandlung über fünf Tage mit 100 mg/kg/d Oseltamivir hatte jedoch eine signifikante Wirkung z. B. auf die Mortalität, das Körpergewicht und den klinischen Score. Oseltamivir wirkte somit am besten gegen das Virus, welches in BALB/c-Mäusen am stärksten replizierte, was auf eine gute NA-HA-Balance hinweist. Sowohl die Infektion mit HA-G222-mpJena/5258 als auch mit mpPotsdam/15 ließ sich durch die prophylaktische Gabe von 75 mg/kg/d Ribavirin über fünf Tage erfolgreich behandeln.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde festgestellt, dass ein HA-222D/G-Polymorphismus die schnelle Evolution von A(H1N1)pdm09-Viren in der Maus ermöglicht. Die stärkere Bindung von H1N1-IAV mit einem HA-G222 an SA α 2,3Gal korreliert mit einer höheren Pathogenität *in vivo*. Zudem verbessert ein HA-G222 die NA-HA-Balance und damit auch die NAI-Empfindlichkeit von H1N1 IAV in der Maus. Die beschriebenen Mausmodelle können für die Testung neuer Anti-Influenza-Medikamente eingesetzt werden, wobei sich IAV mit HA-G222 für die Prüfung der Wirkung neuer NAI eignen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Systematik, Aufbau und Replikation von Influenza-A-Viren

Systematik

Die Influenza-A-Viren (IAV) zählen neben den Gattungen *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Isavirus* und *Thogotovirus* zur Familie der *Orthomyxoviridae*, die durch ein einzelsträngiges, segmentiertes RNA-Genom mit negativer Polarität charakterisiert ist (Palese und Shaw 2007). Unlängst wurden zudem die Virusspezies Quaranfil- und Johnston Atoll Virus aufgrund phylogenetischer, morphologischer und serologischer Untersuchungen (Presti et al. 2009) als neue Gattung *Quaranjavirus* in die Familie der *Orthomyxoviridae* aufgenommen (ICTV 2014).

Die IAV werden anhand ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in derzeit 18 HA- (H1 - H18) und neun NA-Subtypen (N1 - N9) eingeteilt. Davon ließen sich H1 bis H16 sowie alle NA-Subtypen in Vögeln isolieren (Munster und Fouchier 2009). H17 und H18 wurden in Fledermäusen entdeckt (Tong et al. 2012, Tong et al. 2013). Die NA dieser Viren ist jedoch phylogenetisch so verschieden zu der anderer IAV, dass eine Aufnahme in das Subtypensystem als N10 und N11 noch diskutiert wird (Garcia-Sastre 2012).

Wasservögel der Ordnungen *Anseriformes* (u. a. Gänse, Enten, Schwäne) und *Charadriiformes* (u. a. Möwen, Watvögel) stellen den Hauptwirt und das natürliche Reservoir der IAV dar (Munster et al. 2007, Olsen et al. 2006), was durch die Subtypenvielfalt in diesen Tieren unterstrichen wird (Munster et al. 2007). Stabile Infektionsketten bestimmter Subtypen außerhalb der Vögel gibt es zurzeit außerdem im Mensch (H1N1, H3N2), im Schwein (z. B. H1N1, H1N2, H3N2) und im Pferd (H3N8) (Wright et al. 2007). Eine Vielzahl anderer Säugetiere wie beispielsweise Robben, Nerze, Katzen, Tiger, Leoparden, Hunde und Wale wurden zudem als Zufallswirte beschrieben, da bei diesen Tieren vereinzelte Infektionen auftraten (Wahlgren 2011).

Aufbau

IAV sind von pleomorpher Gestalt. Neben sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser von etwa 100 nm treten auch filamentöse Formen auf, deren Länge mehr als 300 nm betragen kann (Wright et al. 2007). Ein einzelnes Virion besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die von der jeweiligen Wirtszellmembran stammt. Das als Trimer vorkommende HA und die

tetramere NA sind in diese Hülle eingelagert (Abbildung 1). Das Matrixprotein 2 (M2) bildet Ionenkanäle. Direkt unterhalb der Lipiddoppelschicht liegt das Matrixprotein 1 (M1). Es stellt den Kontakt zwischen der Virushülle und den sich im Inneren des Virions befindenden acht Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen her. RNP-Komplexe sind aus je einem viralen RNA-Segment, Nukleoproteinen (NP, zusammen RNP) und dem Polymerasekomplex zusammengesetzt. Letzterer besteht aus dem *Polymerase-Basic-Protein 1* (PB1), dem *Polymerase-Basic-Protein 2* (PB2) und dem *Polymerase-Acid-Protein* (PA).

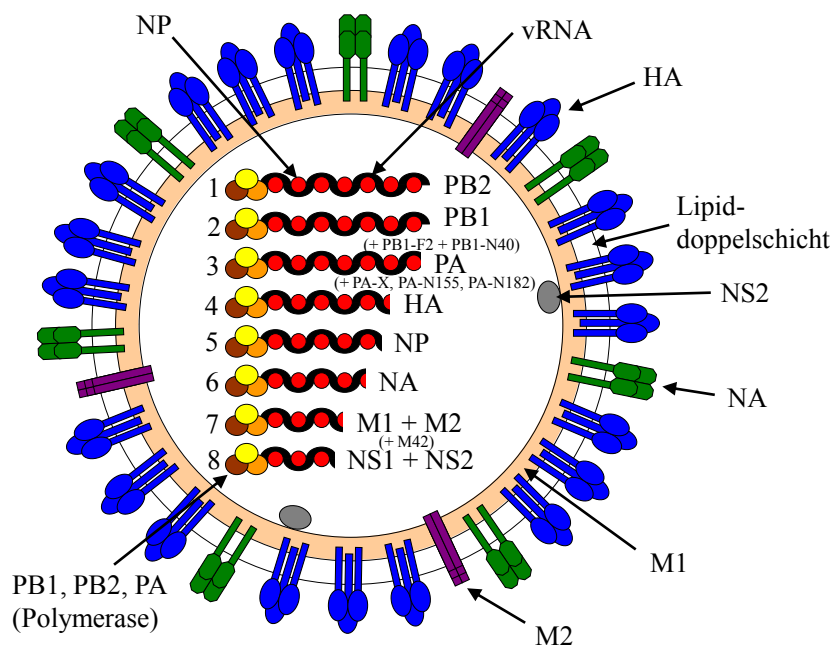


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Influenza-A-Virions

Das Genom der IAV besitzt eine Größe von fast 13.600 Basen und ist in acht RNA-Segmente unterteilt (Wright et al. 2007). Die drei größten Segmente kodieren für die Polymeraseproteine PB1, PB2 und PA. HA, NP und NA werden durch die drei Segmente mittlerer Größe verschlüsselt.

Segment 7 dient zur Synthese der Proteine M1 sowie M2 (Lamb und Choppin 1981) und Segment 8 zur Synthese des Nicht-Struktur-Proteins 1 (NS1) und des Nicht-Struktur-Proteins 2 (NS2) (Lamb und Choppin 1979), welches auch als Nuklear-Export-Protein (NEP) bezeichnet wird. Sowohl M2 als auch NS2 entstehen durch das Zusammenspleißen der mRNA des primären und eines alternativen Leserahmens. Neben diesen zehn Proteinen wurden in den letzten Jahren weitere entdeckt, die von IAV exprimiert werden können und für die Replikation nicht essentiell zu sein scheinen. Dazu zählt das PB1-F2, welches Apoptose speziell in Immunzellen verursachen kann (Chen et al. 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften wird es als Virulenzfaktor betrachtet. Jedoch können nicht alle IAV dieses Protein bilden und auch die Länge ist variabel (Krumbholz et al. 2011). Ein weiteres Protein, welches durch Segment 2 kodiert wird, ist PB1-N40, das eine N-terminal verkürzte Variante des PB1 bildet und dessen Funktion noch unklar ist (Wise et al. 2009). Ebenfalls ein akzessorisches Protein stellt PA-X

dar, für das ein Einfluss auf die Immunantwort des Wirts gezeigt werden konnte (Jagger et al. 2012). Es scheint in allen IAV konserviert zu sein, allerdings können verkürzte Formen auftreten (Shi et al. 2012). Unlängst wurden die beiden N-terminal trunkierten Varianten des PA, PA-N155 und PA-N182, beschrieben, die eine noch nicht näher geklärte Rolle während der Replikation und für die Pathogenität besitzen (Muramoto et al. 2013). Auch Segment 7 kodiert neben M1 und M2 für ein drittes Protein, M42, welches dem M2 stark ähnelt, dieses funktionell ersetzen kann, aber nur von sehr wenigen Viren exprimiert wird (Wise et al. 2012). PA-N155, PA-N182 und PB1-N40 entstehen durch die Nutzung alternativer Startcodons des primären Leserahmens (Muramoto et al. 2013, Wise et al. 2009). Das Ablesen eines anderen Leserahmens führt zur Synthese von PB1-F2 (Chen et al. 2001). Die mRNA für M42 und PA-X resultiert dagegen aus der Benutzung alternativer Leserahmen und dem Spleißen der mRNA (Jagger et al. 2012, Wise et al. 2012).

Replikation

IAV sind für ihre Vermehrung auf den Stoffwechsel von Wirtszellen angewiesen. Den Kontakt stellen die Viren über die Bindung des Oberflächenproteins HA an die auf der Wirtszelloberfläche exprimierten Rezeptoren her. Anschließend wird das angeheftete Virion über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Zur Freisetzung der viralen RNP-Komplexe ist die Verschmelzung der viralen Membran mit der Endosomenmembran nötig. Das bereits zuvor aus dem HA0-Vorläuferprotein in die beiden Untereinheiten HA1 und HA2 gesplattene HA erfährt durch den niedrigen pH-Wert im Endosom eine Konformationsänderung, wodurch es zur Verschmelzung der Endosomenmembran mit der viralen Membran kommt (Stegmann 2000). Gleichzeitig sorgen zu Homotetrameren zusammengelagerte M2-Proteine, die als Ionenkanäle in die Virushülle eingebaut sind, für einen Wasserstoffioneneinstrom in das Virusinnere (Pinto et al. 1992). Die daraus resultierende Ansäuerung ermöglicht die Dissoziation der RNP-Komplexe von den M1-Proteinen, die eine strukturelle Verbindung zwischen Hülle und dem Inneren des Virions bilden. Die freigesetzten RNP-Komplexe gelangen so in das Zytoplasma der Wirtszelle, womit das *Uncoating* abgeschlossen ist.

Eine Besonderheit der Influenzaviren ist ihre Replikation im Zellkern der Wirtszelle. Das Einschleusen der RNP-Komplexe über die Kernporen wird durch Kernlokalisationssignale im NP vermittelt (O'Neill et al. 1995). Für ihre Replikation sind Influenzaviren auf die Cap-Struktur der prä-mRNA des Wirts angewiesen. Diese wird von der PB2-Untereinheit der Polymerase an ihrem 5'-Ende gebunden und durch die Endonukleasefunktion der PA-Untereinheit abgetrennt (Dias et al. 2009). Basenpaarungen in den stark konservierten Enden

der viralen RNA sorgen für die Ausbildung einer Sekundärstruktur, die von der Polymerase als Promotor erkannt wird. Nach der Bindung des 3'-Endes der Cap-Struktur und dem 3'-Ende der viralen RNA im katalytischen Zentrum der PB1-Untereinheit startet die Elongation in 3'-5'-Richtung. Gelangt die Polymerase in die Nähe des 5'-Endes des vRNA-Templates, kommt es zu sterischen Behinderungen, da das Ende noch durch PB1 gebunden ist. Dies hat ein Stottern der Polymerase auf einer Polyuridinsequenz zur Folge, was zum Entstehen eines Poly(A)-Schwanzes und schließlich zum Transkriptionsabbruch führt (Fodor 2013, Palese und Shaw 2007).

Das Spleißen der viralen mRNA und der Export der mRNA aus dem Kern erfolgen mithilfe von Virus- und Wirtspoteinen. Die Translation findet nach der Erkennung der Cap-Struktur an den Wirtszellribosomen statt. In der frühen Phase des Replikationszyklus entstehen hauptsächlich NS1 und NP, in der späten Phase hingegen überwiegend M1, aber auch HA und NA (Palese und Shaw 2007, Shapiro et al. 1987).

Die Replikation der viralen RNA zur Herstellung neuer RNP erfolgt ebenfalls durch die virale Polymerase im Zellkern. Dazu wird zunächst ein Positivstrang hergestellt, der dann als Template für neue Negativstrang-RNA dient (Palese und Shaw 2007, Fodor 2013). Neuere Untersuchungen ergaben, dass für die mRNA-Synthese *cis*-wirkende Polymerasekomplexe, für die identische Replikation jedoch *trans*-wirkende Polymerasen verantwortlich sind (Moeller et al. 2012). Entsprechend diesem Modell wird die mRNA direkt durch die im RNP-Komplex enthaltene Polymerase hergestellt und die Produktion viraler RNA durch neu translatierte Polymerasen übernommen. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, nach denen die Synthese viraler Proteine für die identische Replikation erforderlich ist. Direkt nach ihrer Entstehung wird die virale RNA von NP gebunden und somit stabilisiert. Anschließend erfolgt die Bindung der Polymeraseproteine. Der Export der neu entstandenen RNP-Komplexe aus dem Kern über den zellulären Crm1-Pfad wird durch NS2 vermittelt. Dieses interagiert mit den RNP über M1, das wiederum an NP bindet (Akarsu et al. 2003).

Der Zusammenbau und die Abschnürung neuer Virionen finden apikal in den infizierten Zellen statt. Nach ihrer Translation und posttranslationalen Modifikationen durch den Stoffwechsel der Wirtszelle werden das HA und die NA in Lipid-reiche Regionen (*Lipid rafts*) der Zellmembran eingebaut (Leser und Lamb 2005). M1 lagert sich an die zytoplasmatischen Aminosäuren (AS) des HA und NA an, polymerisiert und bildet so die innere Struktur des neu entstehenden Virions. Aufgrund der Ansammlung dieser Proteine beginnt sich die Zellmembran auszustülpfen. Durch die Interaktion der RNP mit M1 werden

auch sie zur Stelle des Viruszusammenbaus gebracht. M2 integriert zunächst außerhalb der *Lipid rafts* in die Membran und stabilisiert sie. Die Verlagerung vom M2 an den Rand der Lipid-reichen Regionen trägt zum Abschnüren der Virionen bei (Rossman und Lamb 2011). Jedoch bleiben die neu gebildeten Viruspartikel zunächst über die Bindung des HA an Sialinsäuren an die Wirtszelloberfläche gebunden. Erst das Abschneiden der Sialinsäuren durch die NA ermöglicht eine Ausbreitung der Virionen (Palese und Shaw 2007). Während der Replikation von IAV hemmt das NS1 die virusinduzierte Interferonantwort des Wirts und sorgt so für eine effektivere Virusvermehrung (Jia et al. 2010).

2.2 Struktur und Funktion des viralen Hämagglutinins

Struktur des Hämagglutinins

Das HA der IAV ist an der Oberfläche infektiöser Virionen als Homotrimer zu finden (Abbildung 2) (Wiley et al. 1977). Nach dem Transport der mRNA aus dem Zellkern erfolgt die Translation des HA an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER). Das entstehende Peptid wird aufgrund seiner Signalsequenz am N-Terminus kotranslational in das Lumen des ER eingefügt, wo auch die Faltung und Trimerisierung stattfinden (Copeland et al. 1986, Gething et al. 1986). Das Signalpeptid der IAV besitzt eine Länge von 15 bis 18 AS (Nobusawa et al. 1991). Es ist für den Einbau des HA in die Membran essentiell (Sekikawa und Lai 1983), wird aber während der posttranslationalen Modifikation abgetrennt. Vom ER wird das HA weiter in den Golgi-Apparat transportiert und anschließend über Vesikel zur Zellmembran gebracht. Währenddessen erfolgt die N-Glykosylierung des HA (Copeland et al. 1986).

Die entstandenen HA0-Vorläufer können zwar an die Wirtsrezeptoren binden, besitzen jedoch noch keine Fusionsaktivität. Erst durch die enzymatische Spaltung in die beiden Untereinheiten HA1 und HA2 (Lazarowitz und Choppin 1975) wird dies ermöglicht (Abbildung 3).

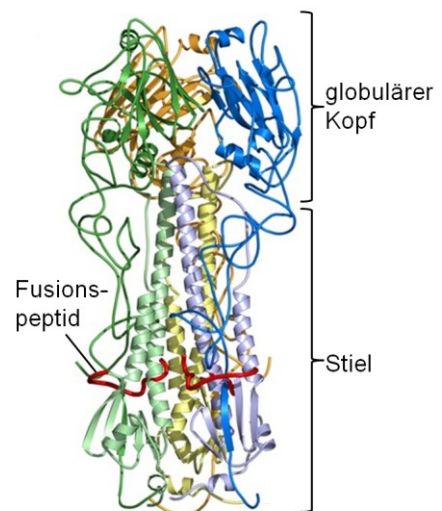


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines HA-Trimers von IAV in der Ausgangskonformation. Die Monomere (blau, gelb, grün) und das Fusionspeptid (rot) sind farblich gekennzeichnet. Die HA1-Untereinheit ist jeweils dunkler dargestellt als die HA2-Untereinheit. Verändert nach Amorij et al. (2008)

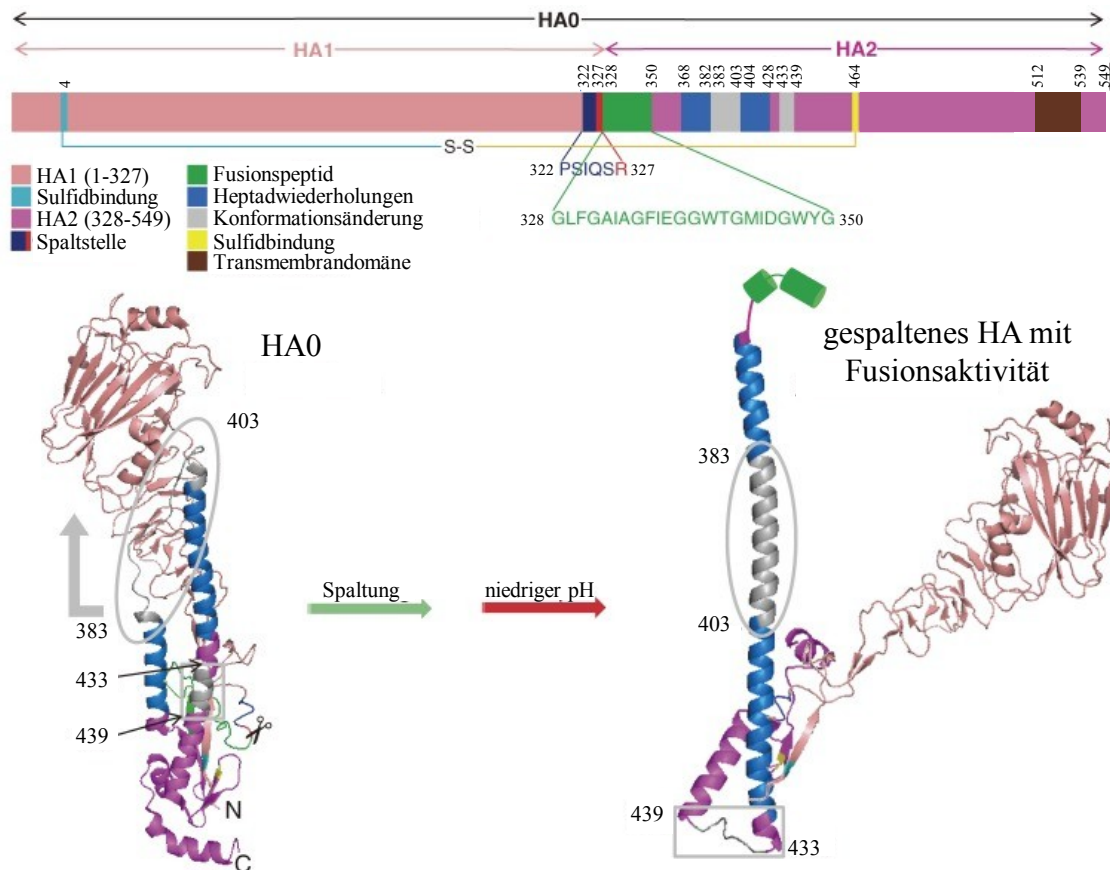


Abbildung 3: Übersicht über wichtige Domänen und strukturelle Veränderungen bei der HA-Spaltung und pH-abhängigen Freilegung des Fusionspeptids am Beispiel eines H1. Die HA0-Numerierung wurde für das ungespaltene und das gespaltene Protein benutzt. Verändert nach Sriwilaijaroen und Suzuki (2012)

In der Ausgangskonformation besteht jedes HA-Monomer aus einer globulären Kopfdomäne sowie einem stielähnlichen Bereich und ist mit der Transmembrandomäne, die sich am C-Terminus des Proteins befindet, in der Virusmembran verankert (Wilson et al. 1981). Die Basis der Kopfdomäne, die nur aus der HA1-Untereinheit besteht, bilden acht antiparallele β -Faltblattstrukturen. Diese enthalten die Rezeptorbindestelle. Das Grundgerüst des Stielbereichs wird von einer kurzen und einer langen, antiparallel verlaufenden α -Helix geformt, die zur HA2-Untereinheit zählt. Durch das ineinander Verwinden der langen Helix dreier Monomere entsteht ein HA-Trimer mit einer *coiled-coil*-Struktur (Abbildung 2). Beide HA-Untereinheiten sind im Stielbereich über eine Spaltstelle verbunden, an die sich das Fusionspeptid anschließt (Abbildung 3). In den meisten IAV wird die Spaltstelle durch ein Arginin (R) an der AS-Position 327 (HA-R327; im weiteren Verlauf der Arbeit wird die H1-Nummerierung genutzt) gebildet (Nobusawa et al. 1991) und spezifisch von Wirtsenzymen erkannt.

HA-vermittelte Rezeptorbindung

Für ihre Vermehrung sind Viren auf den Stoffwechsel einer Wirtszelle angewiesen. Um in diese einzudringen, müssen sie zunächst auf der Zelloberfläche an einen Rezeptor binden. Diese wichtige Funktion wird bei IAV durch das HA übernommen (Palese und Shaw 2007). Als Rezeptoren dienen terminale Neuraminsäuren (auch Sialinsäuren genannt) von Glykolipiden oder Protein-gebundenen Glykanen, die über eine $\alpha 2,3$ - oder $\alpha 2,6$ -Verbindung an Galaktose geknüpft sind (SA $\alpha 2,3$ Gal oder SA $\alpha 2,6$ Gal) (Weis et al. 1988).

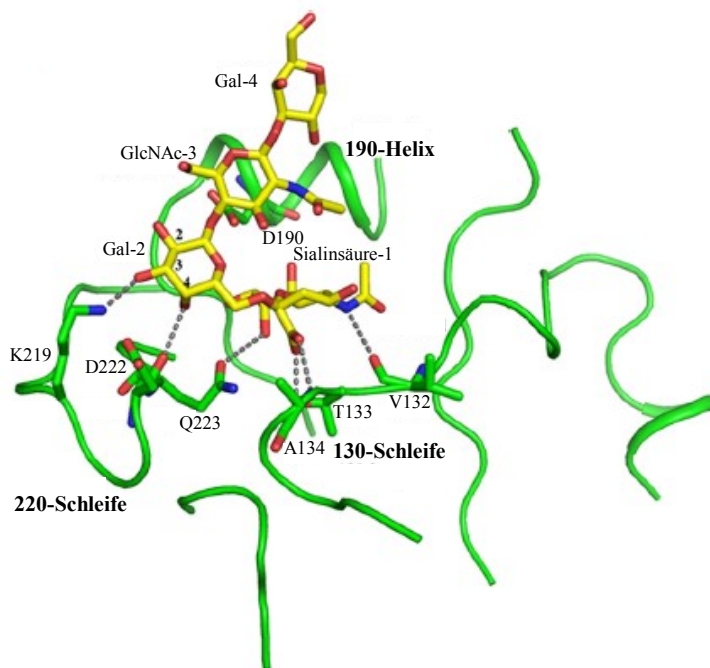


Abbildung 4: Interaktion der Rezeptorbindestelle eines pandemischen H1N1 2009 IAV mit einem humanen Rezeptoranalogen. Dargestellt sind die Grundstruktur der Rezeptorbindestelle mit Kohlenstoffatomen wichtiger AS-Reste (grün) und des Rezeptoranalogs (gelb). Stickstoffatome (blau), Sauerstoffatome (rot) und Interaktionen über Wasserstoffbrücken (gepunktete Linien) sind extra gekennzeichnet. Das humane Rezeptoranalogen besteht aus einer terminalen Sialinsäure, $\alpha 2,6$ -gebunden an Galaktose (Gal) sowie N-Acetylglucosamin (GlcNAc) an dritter und Galaktose an vierter Position. Verändert nach Zhang et al. (2013)

Eine Rezeptorbindestelle befindet sich im globulären Kopf jedes HA-Monomers (Wilson et al. 1981). Die Basis der Rezeptorbindestelle bilden die AS Y91, W150, H180 und Y192 (Skehel und Wiley 2000, Gamblin et al. 2004). Sie sind innerhalb der IAV hoch konserviert (Nobusawa et al. 1991). Die Seiten der Rezeptorbindestelle werden von drei Strukturelementen, der 130-Schleife (AS 131 - 135), der 190-Helix (AS 187 - 195) und der 220-Schleife (AS 218 - 225), gebildet (Gamblin et al. 2004, Skehel und Wiley 2000). AS-Reste dieser Bereiche interagieren über Wasserstoffbrücken mit den verschiedenen Rezeptoren und sorgen so für die Bindung der Viren an die Wirtszelloberfläche (Abbildung 4).

Membranfusion

Nach der Bindung an die Wirtszellrezeptoren erfolgt die Endozytose der Virionen. Durch die Spaltung des HA0 wird am N-Terminus der HA2-Untereinheit, das Fusionspeptid, frei. Das Fusionspeptid ist innerhalb der IAV stark konserviert (Cross et al. 2009). Speziell das Glycin (G) am N-Terminus von HA2 ist für die Fusionsaktivität dringend erforderlich (Cross et al. 2001) (Abbildung 3). Der niedrige pH-Wert innerhalb der Endosomen verursacht deutliche strukturelle Veränderungen innerhalb des HA (Bullough et al. 1994, Bizebard et al. 1995, Chen et al. 1999). Die Kopfdomäne detrimertisiert und klappt seitlich vom Stielbereich nach außen, sodass beide Untereinheiten lediglich über eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen (C) an Position 4 und 464 verbunden sind. Am N-Terminus von HA2 formen sich die AS 383 bis 403 von einer Schleife in eine Helix um. Dadurch wird die kurze mit der langen Helix des ungespaltenen HA0 verbunden, was eine Verlängerung der *coiled-coil*-Struktur bewirkt und das Fusionspeptid aus der hydrophoben Tasche im Stielbereich des HA in die Nähe der endosomalen Membran bringt, in die es schließlich bindet. Weiterhin bedingt die pH-Veränderung die Umbildung einer Helix (AS 433 - 439) in eine Schleife, wodurch der C-terminale Bereich des HA2 um 180° gedreht wird.

Eine wichtige Rolle für die Membranfusion spielen zwei *heptad repeat*-Regionen innerhalb des HA2, die sich über die AS 368 bis 382 und 404 bis 428 erstrecken. Sie zeichnen sich durch die wiederholte Aufeinanderfolge von sieben AS aus, bei denen die erste und vierte Position jeweils eine hydrophobe, nie aber eine geladene AS ist (Chambers et al. 1990). Diese Regionen deuten auf die Ausbildung von α -Helices hin und stellen im HA2 nach der Konformationsänderung den oberen und unteren Teil der *coiled-coil*-Struktur dar. Durch das Einknicken des mittleren Bereichs der Stielregion werden beide durch *heptad repeat*-Regionen gebildete α -Helices antiparallel nebeneinander gelegt (Bullough et al. 1994). Folglich werden auch die durch das Fusionspeptid gebundene Endosomenmembran und die mit der Transmembrandomäne interagierende Virusmembran in räumliche Nähe gebracht, was zur Ausbildung der Fusionspore führt.

Antigenitätsdeterminanten im HA

Das auf der Oberfläche exprimierte HA stellt das Hauptantigen der IAV dar. Es induziert nach der Infektion oder nach einer Impfung die Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Palese und Shaw 2007). Aufgrund ihrer antigenetischen Eigenschaften werden die HA-Subtypen in eine Gruppe 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18) und eine Gruppe 2

(H3, H4, H7, H10, H14 H15) untergliedert. Diese Einteilung stimmt mit der phylogenetischen Verwandtschaft der Viren überein (Nobusawa et al. 1991, Tong et al. 2013).

Um der Neutralisation durch eine Antikörperbindung zu entgehen, sind einige Bereiche auf der Oberfläche des HA in ihrer Sequenz sehr variabel. Untersuchungen, bei denen Mutationen im HA durch die Kultivierung der Viren mit monoklonalen Antikörpern hervorgerufen wurden, führten zur Identifizierung von fünf Antigenerkennungsstellen innerhalb der H1N1-Viren (Caton et al. 1982). Die Bindestellen Sa (AS 124 - 125, 153 - 157, 159 - 164) und Sb (AS 184 - 195) befinden sich an der Spitze der Kopfdomäne. Die Sb-Region liegt innerhalb eines HA-Monomers in der Nähe der Rezeptorbindestelle, wohingegen die Sa-Region erst durch die Trimerisierung in die Nähe der Rezeptorbindestelle eines benachbarten Monomers gelangt. Die Ca-Antigenerkennungsstelle ist in die Regionen Ca1 (AS 166 - 170, 203 - 205, 235 - 237) und Ca2 (AS 137 - 142, 221 - 222) unterteilt. Beide befinden sich auf gegenüberliegenden Seiten der HA-Kopfdomäne eines Monomers. Im HA-Trimer liegen die Ca1- und die Ca2-Region benachbarter Monomere nebeneinander. Die Cb-Antigenerkennungsstelle (AS 70 - 75) wurde an der Basis der Kopfdomäne identifiziert. Obwohl AS, die zu einer Antigenerkennungsstelle gehören, in der Primärsequenz nicht immer zusammenhängen, bilden sie in der Tertiärstruktur des HA eine Oberflächenregion.

Während der posttranslationalen Modifikation werden auf der Oberfläche des HA Glykane an die Glykosylierungsstellen gebunden, die durch das Sequenzmotiv N-X-S/T (wobei X jede AS außer Prolin sein kann) gekennzeichnet sind (Bause 1983). Die Zuckerreste werden über eine N-glykosidische Bindung an Asparagin (N) angehängt (Mir-Shekari et al. 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Glykosylierung des HA für die korrekte Proteinfaltung und den Transport zur Zellmembran notwendig ist (Gallagher et al. 1992, Roberts et al. 1993). Jedoch sind nicht alle Glykosylierungen für diese Prozesse von Bedeutung (Klenk et al. 2002). Die angehängten Glykane tragen dazu bei, die IAV vor der Erkennung durch das Immunsystem des Wirts zu schützen (Abe et al. 2004). Die Komplexität und Zusammensetzung der Zuckerreste hängt von der jeweiligen Wirtszelle und dem Virus ab (Schwarzer et al. 2009).

2.3 Bedeutung des Hämagglutinins für den Tropismus, die Pathogenität und die Epidemiologie von Influenza-A-Viren

Der Einfluss des HA auf den Wirts- und Organotropismus von IAV

Das HA besitzt eine besondere Bedeutung für den Tropismus von IAV, da es für die Rezeptorbindung und damit den initialen Schritt der Infektion verantwortlich ist. Humane

IAV nutzen bevorzugt SA α 2,6Gal als Rezeptor, während aviäre IAV SA α 2,3Gal bevorzugen (Connor et al. 1994, Rogers und D'Souza 1989). Porzine IAV sind in der Lage beide Rezeptortypen zu binden (Matrosovich et al. 2000). Diese beobachteten Unterschiede stimmen grundsätzlich mit dem Expressionsmuster der Sialinsäuren am primären Replikationsort der Viren überein. So sind SA α 2,6Gal im Nasen-Rachen-Raum, der Trachea und den Bronchien des Menschen weit verbreitet (Shinya et al. 2006, van Riel et al. 2007). Im Vergleich dazu replizieren aviäre IAV in Enten, ihren natürlichen Wirten, im Intestinaltrakt, der hauptsächlich SA α 2,3Gal exprimiert (Ito et al. 1998). Beide Rezeptoren wurden im Respirationstrakt von Schweinen nachgewiesen (Ito et al. 1998, Nelli et al. 2010, Trebbien et al. 2011, Van Poucke et al. 2010).

Die effiziente Übertragung der Viren von Wirt zu Wirt ist deshalb meist nur innerhalb einer Wirtsspezies möglich. Selten erfolgen Infektionen aviärer H5-, H7- und H9-Viren beim Menschen (Abdel-Ghafar et al. 2008, Fouchier et al. 2004, Subbarao et al. 1998, Belser et al. 2009, Peiris et al. 1999) und anderen Säugetieren wie beispielsweise Katzen (Songserm et al. 2006a), Hunden (Songserm et al. 2006b) und Schweinen (Choi et al. 2005). Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung der aviären Viren wurde für Einzelfälle beschrieben (Yang et al. 2007, Koopmans et al. 2004). Typischerweise infizierten sich Menschen durch den Kontakt mit infiziertem Geflügel (Abdel-Ghafar et al. 2008). Die aviären Viren müssen die unteren Atemwege erreichen, um eine Infektion in Menschen zu verursachen, da im oberen Teil SA α 2,6Gal auf den Epithelzellen überwiegen und nur in der Lunge vermehrt SA α 2,3Gal vorkommen (Shinya et al. 2006, van Riel et al. 2007). Diese werden speziell auf Typ II-Pneumozyten exprimiert, welche von den aviären Viren infiziert werden (Uiprasertkul et al. 2005, van Riel et al. 2007).

Eine zentrale Rolle bei der Übertragung von IAV zwischen verschiedenen Wirtsspezies spielen Schweine, da sie sowohl den aviären als auch den humanen Rezeptor exprimieren (Ito et al. 1998) und somit von aviären und humanen Viren infiziert werden können (Kida et al. 1994, Brown 2000, Londt et al. 2013). Aus diesem Grund entstand die Theorie, dass Schweine eine Art Mischgefäß für die Entstehung neuer Reassortanten darstellen (Scholtissek 1995). Zusätzlich begünstigen sie die Anpassung aviärer Viren an den humanen Rezeptor, was eine effiziente Infektion und Übertragung im neuen Wirt zur Folge haben kann. Ein Beispiel für die weitreichenden Folgen der Reassortierung von aviären, porzinen und humanen Viren stellt die Influenzapandemie von 2009/10 dar, die durch neue IAV vom Subtyp H1N1 hervorgerufen wurde (Smith et al. 2009, Garten et al. 2009). Das HA dieser Viren stammte von einem klassischen, porzinen H1N1-Virus ab.

Die Bedeutung des HA für die Pathogenität von IAV

Die Pathogenität von IAV wird durch mehrere das HA betreffende Eigenschaften wie die Spaltung des HA0-Vorläuferproteins, die funktionelle NA-HA-Balance und N-Glykosylierungen beeinflusst. Daneben spielen der antigenetische Drift und der antigenetische *Shift* eine wichtige Rolle für die Pathogenität, da sie für die Epidemiologie der IAV von Bedeutung sind.

Die Spaltung des HA0-Vorläuferproteins in die beiden Untereinheiten HA1 und HA2 ist für die Fusion der viralen mit der endosomalen Wirtszellmembran und somit für die Replikation der IAV erforderlich. Sie erfolgt bei den meisten Viren an der AS R327 (Nobusawa et al. 1991) durch Trypsin-ähnliche Serin-Endoproteasen (Klenk et al. 1975). In der Vergangenheit wurden verschiedene dieser Enzymgruppe angehörende Proteine in Säugetieren identifiziert. Dazu zählen beispielsweise die Tryptase Clara (Kido et al. 1992), das Mini-Plasmin (Murakami et al. 2001), das *Ectopic Anionic Trypsin I* (Towatari et al. 2002), die Mastzell-Tryptase (Chen et al. 2000) oder die Tryptase TC30 (Sato et al. 2003). Erst später wurden die im Mensch für die Spaltung verantwortlichen Proteine *Human Airway Trypsin-like Protease* (HAT), *Transmembrane Protease Serine 2* (TMPRSS2) (Bottcher et al. 2006) und TMPRSS4 (Bertram et al. 2010) gefunden. Alle diese Enzyme werden nur im Respirationstrakt exprimiert, woraus sich der Gewebetropismus der IAV in Säugetieren ableitet.

Einige aviäre Viren des Subtyps H5 und H7 besitzen eine multibasische Spaltstelle, die durch das AS-Motiv R-X-K/R-R gekennzeichnet ist und von Kalzium-abhängigen, Subtilisin-ähnlichen Serin-Endoproteasen wie Furin gespalten wird (Stieneke-Grober et al. 1992). Eine weitere Enzymgruppe, die multibasische Spaltstellen mit den Motiven K-K/R-K/T-R und R-X-K/R-R trennen kann, sind die Typ II Membran-Serin-Proteasen wie TMPRSS13 und *Mosaic Serine Protease Large Form* (MSPL) (Okumura et al. 2010). Da diese Enzyme in vielen verschiedenen Zelltypen vorkommen, verursachen IAV mit multibasischer Spaltstelle systemische Infektionen. Aviäre Viren, die eine solche Spaltstelle tragen werden als *Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses* (HPAIV) bezeichnet. Multibasische Spaltstellen entstehen meist nach dem Eintrag der Viren in domestiziertes Geflügel durch Mutationen in der Spaltstellenregion (Alexander 2007). Die HPAIV führen in den Tieren zu schweren Erkrankungen mit einer hohen Mortalitätsrate. In wildlebenden Wasservögeln reicht das Krankheitsbild der HPAIV-Infektionen, abhängig von der jeweiligen Spezies, von asymptomatischen oder milden bis hin zu schweren Erkrankungen mit tödlichem Ausgang (Cardona et al. 2009). H5N1 HPAIV-Infektionen im Mensch verursachen meist schwere Pneumonien mit systemischer Virusausbreitung, begleitet von einer hohen Zytokin- sowie

Chemokinausschüttung und verlaufen in etwa 60 % der Fälle tödlich (Abdel-Ghafar et al. 2008, de Jong et al. 2006). Dies unterstreicht die Bedeutung der multibasischen Spaltstelle für die Pathogenität der Viren.

Aviäre IAV, die nur ein R an der Spaltstelle besitzen, werden als *Low Pathogenic Avian Influenza Viruses* (LPAIV) bezeichnet (Munster und Fouchier 2009). Sie sind nicht pathogen für Wildgeflügel, können jedoch in domestiziertem Geflügel milde Erkrankungen auslösen.

Eine Besonderheit der IAV ist die Tatsache, dass die beiden Oberflächenproteine HA und NA mit denselben Molekülen der Wirtszelloberfläche interagieren. Während das HA durch die Bindung an Sialinsäuren für den Kontakt mit der Wirtszelle sorgt und so die Grundlage für eine erfolgreiche Infektion schafft, schneidet die NA die Sialinsäuren von der Wirtszelloberfläche ab, um die Freisetzung und Ausbreitung der Viren am Ende eines Replikationszyklus zu gewährleisten (Palese und Shaw 2007). Für eine effektive Virusvermehrung und eine Übertragung von Wirt zu Wirt ist eine Balance zwischen beiden Funktionen erforderlich (Gen et al. 2013, Yen et al. 2011). Für diese Balance, die von der Wirtsspezies abhängig ist, spielt die Rezeptor- bzw. Substratspezifität des HA und der NA eine große Rolle (Wagner et al. 2002).

Durch Reassortierungsereignisse können HA- und NA-Proteine gepaart werden, die ein funktionelles Ungleichgewicht aufweisen (Wagner et al. 2002). Adaptive Mutationen im HA, der NA oder in beiden Proteinen können zur Anpassung an den jeweiligen Wirt führen und somit die funktionelle Balance wieder herstellen (Kaverin et al. 1998, Mitnaul et al. 2000). Eine geringe NA-Aktivität kann so beispielsweise durch eine Aktivitätserhöhung oder auch durch die Reduzierung der HA-Rezeptorbindeaffinität ausgeglichen werden (Kaverin et al. 2000). Viren, die an ihren Wirt adaptiert sind, besitzen eine gute NA-HA-Balance.

Antikörper, die gegen das HA gerichtet sind, können sowohl die Rezeptorbindung (Knossow et al. 2002) als auch die Fusionsaktivität (Ekiert et al. 2009) blockieren. Da beides für die Replikation der IAV erforderlich ist, trägt das Verhindern der Antikörpererkennung indirekt zu einer stärkeren Pathogenität der Viren bei. Unter anderem schützt die N-Glykosylierung das HA vor einer Erkennung durch Antikörper. Insbesondere Glykosylierungen am globulären Kopf des HA dienen zur Maskierung der Antigenerkennungsstellen, die sich in diesem Teil des Proteins befinden (Abe et al. 2004, Munk et al. 1992, Skehel et al. 1984). Jedoch können für die Viren durch die N-Glykosylierung auch Nachteile entstehen, die in Form von „Fitnesskosten“ deutlich werden (Das et al. 2011). Durch sterische Hinderung kann das Anhängen der Glykane die Bindungsstärke des HA an den Rezeptor verringern und so zu einer verminderten Replikationsfähigkeit führen (Gambaryan et al. 1998, Ohuchi et al. 1997).

Zudem besteht die Möglichkeit, dass Glykosylierungen die Rezeptorspezifität und die Übertragung der Viren beeinflussen (Kim und Park 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Glykane ein Ziel für die Lektin-vermittelte Erkennung der angeborenen Immunantwort darstellen (Reading et al. 2007). Offensichtlich muss für eine effektive Replikation eine Balance zwischen pathogenitätssteigernden und -inhibierenden Eigenschaften gewährleistet sein. Eine weitere Möglichkeit die Antikörpererkennung negativ zu beeinflussen, besteht in der Verschiebung der vorhandenen Glykosylierungsstellen innerhalb des HA (Sun et al. 2012).

Die Rolle des HA für die Epidemiologie der IAV

Eine Influenzavirusinfektion resultiert nach einer Inkubationszeit von ein bis fünf Tagen häufig in einer Tracheobronchitis, typischerweise begleitet von Symptomen wie Husten, Fieber, Niesen, vermehrte Absonderung von Nasenschleimhautsekret, Unwohlsein, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Kurzatmigkeit, Kopf- und Muskelschmerzen. Die Erkrankung kann aber auch asymptomatisch verlaufen. Bei Beteiligung des alveolären Gewebes ist eine virale oder eine bakterielle Pneumonie, hervorgerufen durch eine bakterielle Sekundärinfektion, möglich (Kuiken und Taubenberger 2008).

Die jährlich auftretende Häufung von Influenzaerkrankungen beim Mensch in den gemäßigten Klimazonen während der Wintermonate wird als saisonale Influenza bezeichnet. Die saisonale Influenza verursacht jedes Jahr weltweit zwischen drei und fünf Millionen schwere Erkrankungen und führt zu 250.000 bis 500.000 Todesfällen (WHO 2009). Als besonders gefährdet gelten ältere Menschen (über 65 Jahre), Kleinkinder (unter 2 Jahre) und Personen mit bestehenden Grunderkrankungen (Mertz et al. 2013). Eine zeitliche und örtliche Häufung von Influenzaerkrankungen wird auch als Epidemie bezeichnet. Daneben kommt es in längeren Abständen immer wieder zu Pandemien, die durch eine stark erhöhte Morbidität und teilweise auch Mortalität gekennzeichnet sind. Zudem breitet sich die Erkrankung meist schnell aus und ist nicht jahreszeitlich gebunden.

Die Ursache für Influenzaepidemien stellt der antigenetische Drift dar. Er ist eine Folge des genetischen Drifts. Dieser wird durch die mangelnde Korrekturlesefunktion der viralen Polymerase verursacht (Steinhauer et al. 1992), sodass bei der Replikation der IAV Substitutionsraten von 10^{-5} bis 10^{-6} Substitutionen/Position/Replikationszyklus auftreten (Nobusawa und Sato 2006, Parvin et al. 1986, Stech et al. 1999). Viele der so entstehenden Substitutionen, die die virale Fitness beeinträchtigen, unterliegen der negativen Selektion (Domingo et al. 2012). Zu den wenigen Bereichen innerhalb des Virusgenoms, die positiv

selektioniert sind, zählen die Antigenerkennungsstellen des HA (Fitch et al. 1991). Ein Austausch dieser AS verringert die Bindung von Antikörpern und führt so zu einer schlechteren Neutralisation des Virus durch die humorale Wirtsabwehr (Gerhard und Webster 1978). Bereits die Substitution von ein bis zwei AS innerhalb der Antigenerkennungsstellen kann eine signifikante Reduktion der Antikörperbindung auslösen (Strengell et al. 2011). Die allmähliche Veränderung der Antigenerkennungsstellen des HA wird als antigenetischer Drift bezeichnet. In geringerem Maße wird dieser Prozess auch für die NA beobachtet (Kilbourne et al. 1990). Jedoch stellt das HA das wichtigere Antigen dar, da Antikörper gegen dieses Protein ausreichen, um einen effektiven Infektionsschutz zu erreichen (Treanor et al. 2011).

Aufgrund des antigenetischen Drifts muss die Zusammensetzung der Influenzaimpfung jährlich überprüft und gegebenenfalls angepasst werden, um einen ausreichenden Schutz zu vermitteln (Kelly et al. 2009). Da die Produktion der Impfstoffe mehrere Monate dauert, werden die Impfstämme anhand epidemiologischer Daten der vergangenen Jahre bereits vor einer Influenzasaison ausgewählt. So kann es vorkommen, dass die Impfstämme nicht mit den tatsächlich zirkulierenden Viren übereinstimmen, was zu erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten führt (de Jong et al. 2000). Die durch Impfungen und natürliche Infektionen hervorgerufene Immunantwort verursacht einen hohen Selektionsdruck, wodurch der antigenetische Drift humaner IAV gefördert wird. Für porcine Viren, die ähnliche Substitutionsraten wie humane IAV aufweisen, wurden geringere Veränderungen der antigenetischen Eigenschaften festgestellt. Eine Ursache könnte die vergleichsweise kurze Lebensspanne von Schweinen und damit ein geringerer Selektionsdruck durch das Immunsystem sein (de Jong et al. 2007).

Eine Voraussetzung für die Entstehung einer Pandemie ist ein antigenetischer *Shift* (Scholtissek 1987). Da die Oberflächenproteine HA und NA die bedeutendsten Antigene der IAV sind, trägt ein Austausch der dafür kodierenden Segmente maßgeblich zur Veränderung der antigenetischen Eigenschaften bei. Ein hohes pandemisches Potenzial entsteht durch den Wechsel des HA- und des NA-Subtyps oder auch nur des HA-Subtyps. Gelangt ein Virus mit neuen antigenetischen Eigenschaften in eine Population mit keiner oder geringer Immunität und Kreuzreaktivität gegen diese Variante, kann eine Pandemie auftreten. Ein antigenetischer *Shift* kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden. Eine Möglichkeit stellt der Eintrag eines kompletten Virusgenoms aus einem anderen Wirt in eine naive Population dar. Weiterhin kann eine neue Virusvariante auch durch Reassortierung entstehen, wenn eine Wirtszelle gleichzeitig von mindestens zwei verschiedenen Viren infiziert wird.

Als schwerste jemals dokumentierte Influenzapandemie gilt die „Spanische Grippe“ von 1918/19, an der geschätzt etwa 50 Millionen Menschen starben (Johnson und Mueller 2002). Untersuchungen ergaben, dass es sich um ein H1N1-Virus handelte, welches ursprünglich von Vögeln stammte (Reid et al. 1999, Reid et al. 2000, Taubenberger et al. 1997). Jedoch ist bis heute unklar, in welchem Wirt sich der direkte Vorgänger des humanen Virus replizierte (Reid et al. 2004). Nach 1918/19 entstand aus diesem Virus eine saisonal wiederkehrende, humane H1N1-Linie. Das für die Pandemie verantwortliche Virus wurde auch auf Schweine übertragen und etablierte in diesem Wirt ebenfalls eine stabile Infektionskette (klassische, porzine H1N1) (Brockwell-Staats et al. 2009).

Die 1957/58 durch ein H2N2-Virus verursachte Pandemie („Asiatische Grippe“), entstand durch die Reassortierung eines humanen H1N1 mit einem aviären Virus, wobei das aviäre HA-, NA- und PB1-Segment in das humane Virus eingetragen wurden (Kawaoka et al. 1989, Scholtissek et al. 1978). Die seit 1918 etablierte H1N1-Linie verschwand und das H2N2-Virus zirkulierte bis zum Auftreten der „Hongkong-Grippe“ 1968/69, ehe es wiederum von dem dafür verantwortlichen Virus verdrängt wurde (Taubenberger und Morens 2010). Ursache der Pandemie von 1968/69 war ein H3N2-Virus, bei dem durch Reassortierung das HA- und PB1-Segment eines H2N2-Virus durch aviäre Segmente ersetzt wurden (Kawaoka et al. 1989, Scholtissek et al. 1978). Das Hongkong-Virus verdeutlicht, dass der Austausch des HA-Antigens ausreichend ist, um eine neue Pandemie auszulösen und unterstreicht damit die Rolle dieses Proteins für die Epidemiologie der IAV.

1977 breiteten sich Viren des Subtyps H1N1 aufgrund einer fehlenden Immunität in der jüngeren Bevölkerung erneut weltweit aus. Wegen ihrer hohen Sequenzidentität zu H1N1-Viren, die vor 1957 zirkulierten, geht man von einem fehlgeschlagenen Impfversuch aus (Nakajima et al. 1978, Palese 2004). Seither zirkulierten die H3N2- und H1N1-Viren parallel (Palese und Wang 2011).

Die letzte Pandemie wurde im April 2009 durch ein mehrfach reassortiertes H1N1-Virus ausgelöst (A(H1N1)pdm09) (Garten et al. 2009, Smith et al. 2009). Dieses enthält das PB1-, PB2-, PA-, HA-, NP- und NS-Segment eines nordamerikanischen, dreifach reassortierten, porzinen Virus, das durch nochmalige Reassortierung nach 1998 auch ein HA-Segment eines klassischen, porzinen H1N1-Virus trägt, und das NA- und M-Segment eines eurasischen, porzinen, *avian-like* IAV. (Abbildung 5) (Garten et al. 2009, Smith et al. 2009). Nach Ende der Pandemie 2010 ersetzten die A(H1N1)pdm09-Viren die zuvor zirkulierenden saisonalen, humanen H1N1-Viren (Palese und Wang 2011).

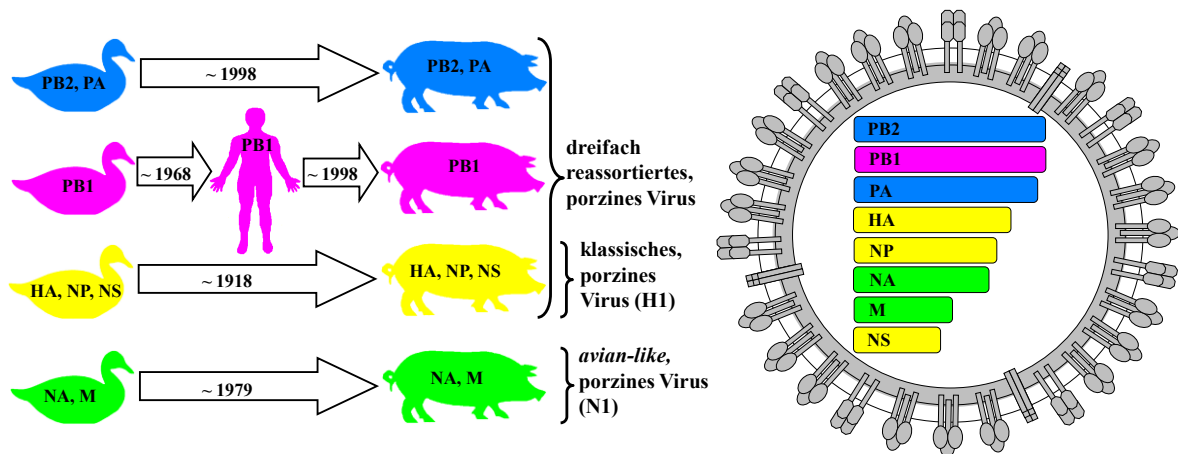


Abbildung 5: Ursprung und Zusammensetzung der Gensegmente eines A(H1N1)pdm09-Viruses

Einfluss der Hämagglutinin-Position 222 (HA-222) auf die Pathogenität von H1N1-IAV

Die HA-222 ist ein Teil der Antigenerkennungsstelle Ca2 (Igarashi et al. 2010) und unterliegt damit dem antigenetischen Drift. Austausch an dieser Position können die Erkennung durch das Immunsystem des Wirts verschlechtern und so die Pathogenität erhöhen.

Weiterhin spielt die HA-222 zusammen mit der HA-187 eine entscheidende Rolle für die Rezeptorspezifität von H1-Viren. Während die bevorzugte Bindung aviärer Viren an SA α 2,3Gal durch ein HA-E187 und ein HA-G222 vermittelt wird, unterstützt Asparaginsäure (D) an beiden HA-Positionen in humanen IAV die Bindung an SA α 2,6Gal (Stevens et al. 2006). H1-Viren von Schweinen weisen meist ein HA-D187 und ein HA-G222 auf, was die Erkennung beider Rezeptortypen zur Folge hat (Matrosovich et al. 2000). Die gleiche AS-Paarung wurde bei humanen Isolaten der Pandemie von 1918 und einigen Isolaten der Pandemie von 2009 festgestellt, wodurch diese Viren ebenfalls in der Lage sind, beide Rezeptortypen zu binden (Chutinimitkul et al. 2010, Liu et al. 2010, Takemae et al. 2010, Glaser et al. 2005, Stevens et al. 2006).

Die HA-D222G wurde während der Adaptation von A(H1N1)pdm09-Viren an die Maus beobachtet (Ilyushina et al. 2010, Sakabe et al. 2011, Seyer et al. 2012, Zheng et al. 2010). In mehreren Publikationen wird dieser AS-Austausch mit einer Steigerung der Pathogenität in den Tieren in Verbindung gebracht (Abed et al. 2011b, Seyer et al. 2012, Xu et al. 2010, Zheng et al. 2010), aber nicht alle Studien konnten dies belegen (Chutinimitkul et al. 2010).

In verschiedenen Publikationen wurde ein Zusammenhang zwischen A(H1N1)pdm09-Viren mit einem HA-G222 und schweren oder fatalen Krankheitsverläufen beim Menschen vermutet, da die duale Rezeptorspezifität eine gesteigerte Replikation im unteren Respirationstrakt ermöglicht (Chen et al. 2010, Mak et al. 2010, Miller et al. 2010, Vazquez-

Perez et al. 2013, Kilander et al. 2010). Jedoch ist die Datenlagen hierzu nicht eindeutig, da Viren mit einem HA-G222 auch vereinzelt bei Erkrankungen mit milden Verläufen gefunden wurden (Melidou et al. 2010, Wang et al. 2011). Häufig erfolgte die Isolation von HA-222-Quasispezies, die einen HA-222D/G-Polymorphismus und teilweise noch weitere AS-Varianten an der HA-222 aufwiesen (Chen et al. 2010, Kilander et al. 2010, Mak et al. 2010, Miller et al. 2010, Wang et al. 2011, Wedde et al. 2013). Ein Einfluss dieser Quasispezies auf die Pathogenität wurde in diesem Zusammenhang diskutiert, jedoch bisher noch nicht bewiesen.

2.4 Einfluss des Hämagglutinins auf die Prophylaxe und Therapie der Influenza

Impfung

Die Impfung stellt die effektivste Maßnahme zur Prophylaxe der Influenza dar (WHO 2009). Mit der Entwicklung eines Impfstoffs wurde bereits kurz nach der Isolierung des ersten humanen IAV 1933 (Smith et al. 1933) begonnen (Francis und Magill 1937). Seit 1978 werden trivalente Impfstoffe verwendet. Basierend auf Daten aus der Überwachung der weltweiten Influenzaaktivität gibt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) jährlich eine Empfehlung ab, welche Impfstämme eingesetzt werden sollen. Nach Ende der Pandemie von 2009/10 besteht die Impfung aus einem saisonalen H3N2-, einem A(H1N1)pdm09- und einem Influenza-B-Virus. Da in den vergangenen Jahren sowohl Influenza-B-Viren der Viktoria- als auch der Yamagata-Linie zirkulierten, wurden in der Saison 2013/14 beide Linien in die Impfstoffproduktion einbezogen, sodass nun tetravalente Impfstoffe angeboten werden (WHO 2013).

Eingesetzt werden einerseits Split- oder *Subunit*-Vakzine, die intramuskulär gespritzt werden und andererseits lebende, attenuierte Viren, die intranasal verabreicht werden (Noh und Kim 2013). Der Einsatz von Adjuvantien verstärkt die Immunantwort gegen die Virusantigene, wodurch ein besserer Schutz entsteht (Reed et al. 2013). Wenn die Impfstämme mit den zirkulierenden Viren gut übereinstimmen, erreichen diese Impfungen in gesunden Kindern und Erwachsenen (unter 65 Jahren) eine Wirksamkeit von 78 %, wobei die inaktivierten Viren bei Erwachsenen und die lebenden, attenuierten Viren bei Kindern besser wirksam sind (DiazGranados et al. 2012). Aufgrund der Abnahme der Immunantwort im Alter (Lambert et al. 2012), wird bei Erwachsenen über 65 nur noch eine Wirksamkeit von 49 % erreicht (Beyer et al. 2013). Jedoch sorgt die Impfung für eine deutliche Senkung der Mortalität (Vu et al. 2002). Somit stellen Impfungen eine effektive Methode dar, die Morbiditäts- und Mortalitätsraten der saisonalen Influenza prophylaktisch zu senken.

Virustatika

Für die Prophylaxe bei Ausbruchsgeschehen und für die antivirale Therapie beim Mensch sind weltweit derzeit Substanzen zugelassen, die gegen den M2-Ionenkanal oder die NA gerichtet sind. Zudem stehen Medikamente mit breitem Wirkspektrum wie beispielsweise Ribavirin (Sidwell et al. 1972) zur Influenzatherapie zur Verfügung. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Nukleosidanalogen, worauf die Wirkung gegen eine Vielzahl von DNA- und RNA-Viren zurückgeführt wird. Derzeit ist es zur Therapie von Hepatitis C- und Respiratorischen-Synzytial-Virus-Erkrankungen zugelassen. In Versuchen mit Mäusen und Menschen zeigte die Substanz eine Anti-Influenza-Wirkung (Magnussen et al. 1977, Sidwell et al. 1972). Aufgrund der Nebenwirkungen wird eine Behandlung mit Ribavirin als Notfallmedikament jedoch nur in Ausnahmefällen genehmigt (Chan-Tack et al. 2009).

Im Gegensatz dazu wirken die M2-Ionenkanalblocker direkt gegen das Virus, indem sie das Ansäuern des Virusinneren und damit die Freisetzung der viralen RNA in die Wirtszelle verhindern (Hay et al. 1985). Zu dieser Wirkstoffgruppe der Adamantane zählen Amantadin-Hydrochlorid und Rimantadin-Hydrochlorid, ein Amantadin-Derivat, das geringere

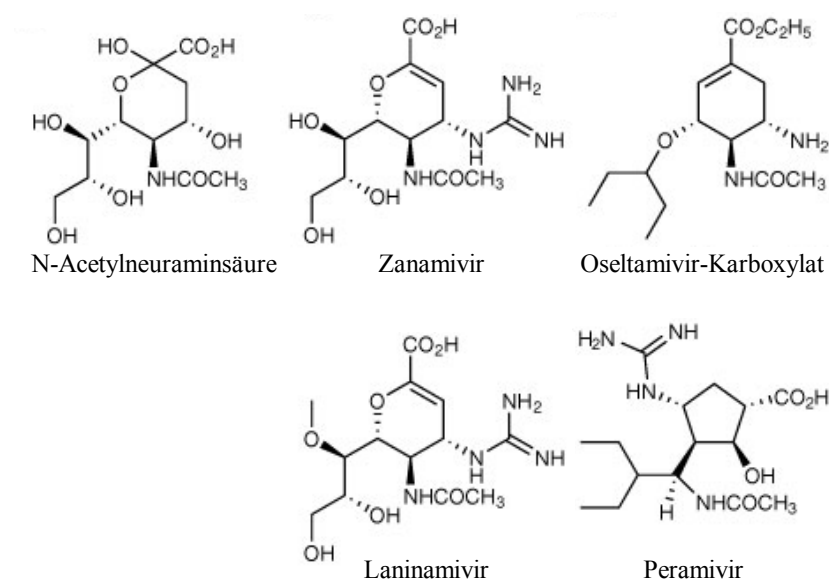


Abbildung 6: Chemische Struktur des natürlichen NA-Substrates und verschiedener NAI

Nebenwirkungen zeigt (Jefferson et al. 2006). Resistenzen gegen beide Substanzen wurden bis zur Influenzasaison 2003/04 nur sehr selten beobachtet (Belshe et al. 1989, Ziegler et al. 1999). Dann stieg die Resistenzrate bei humanen H3N2-Viren weltweit auf über 10 % an (Bright et al. 2005).

In der Saison 2005/06 waren bereits 90 % der H3N2-Viren und 16 % der saisonalen H1N1-Viren resistent (Deyde et al. 2007). Weiterhin besitzen die nach 1987 isolierten, eurasischen, porzinen IAV der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 Adamantan-Resistenz-vermittelnde Mutationen (Schmidtke et al. 2006, Krumbholz et al. 2009). Da die A(H1N1)pdm09-Viren das M-Segment eines eurasischen, porzinen IAV besitzen, wurde die Adamantan-Resistenz ebenfalls

auf diese Viren übertragen (Gubareva et al. 2009, Garten et al. 2009). In den meisten Fällen geht die Resistenz auf die Mutation S31N im M2 zurück, jedoch sind auch Resistenzvermittelnde Mutationen an den Position 26, 27, 30, und 34 beschrieben (Abed et al. 2005). Aufgrund der Resistenzen gegenüber den derzeit zirkulierenden IAV und einer fehlenden Wirkung der Substanzen gegen Influenza-B-Viren (Davies et al. 1964, Mould et al. 2003) werden sie aktuell nicht mehr für die Influenzatherapie empfohlen (Fiore et al. 2011).

Somit stellen die NA-Inhibitoren (NAI) momentan die einzigen weltweit verfügbaren Anti-Influenza-Wirkstoffe dar (Abbildung 6). Sie verhindern durch ihre Bindung in das aktive Zentrum der NA die Sialinsäureabspaltung und damit die effektive Ausbreitung der Viren (Kim et al. 1998, von Itzstein et al. 1993). Anhand von Kristallstrukturanalysen wurde zunächst der NAI Zanamivir entwickelt (von Itzstein et al. 1993) und als Inhalationsmedikament zur Behandlung der Grippe 1999 in den USA zugelassen. Kurze Zeit später erhielt ein zweites Medikament, Oseltamivir, die Zulassung. Es wurde basierend auf der Struktur von Zanamivir entwickelt (Kim et al. 1997). Die Behandlung erfolgt über die orale Einnahme des inaktiven Vorläufers Oseltamivir-Phosphat, welches im Körper durch Leber-Karboxylesterasen in die antiviral wirksame Substanz Oseltamivir-Karboxylat umgewandelt wird (Shi et al. 2006). 2010 wurde in Japan und Südkorea die intravenös verabreichbare Substanz Peramivir (Babu et al. 2000) und im gleichen Jahr in Japan Laninamivir (Yamashita et al. 2009) zugelassen. Laninamivir wird ebenfalls inhalativ eingesetzt, jedoch ist aufgrund der lang anhaltenden Wirkung eine einmalige Gabe ausreichend. Ein Vorteil der NAI ist ihre Wirkung gegen IAV und Influenza-B-Viren (Woods et al. 1993).

Schon kurz nach Zulassung der ersten NAI wurden vereinzelt Resistenzen festgestellt. Jedoch blieb die Resistenzrate bis zur Saison 2006/07 unter 3 % (Monto et al. 2006, Tashiro et al. 2009, Sheu et al. 2008). Da die NAI in das aktive Zentrum der NA binden, sind Resistenzen oft mit Mutationen in diesem Bereich verbunden (Nguyen et al. 2012a). Das aktive Zentrum der NA besteht aus funktionellen AS (R118, D151, R152, R225, E277, R293, R368, Y402), die direkt mit dem Substrat interagieren und strukturell bedeutenden AS (E119, R156, W179, S180, D199, I223, E228, H275, E278, N295, E425), die die funktionellen AS stabilisieren und die Bindetasche ausformen (Burmeister et al. 1992, Colman et al. 1993, Colman et al. 1983). Daneben gibt es noch einige andere AS-Austausche, die eine NAI-Resistenz oder eine reduzierte Empfindlichkeit bewirken können (Nguyen et al. 2012a). Untersuchungen ergaben, dass Resistenzmutationen in der NA zu einem Fitnessverlust der Viren führen, der sich in geringen Titern bei der *In vitro*-Replikation, einer niedrigeren Pathogenität in Mäusen und

Frettchen sowie einer schlechten Übertragung in Frettchen zeigt (Abed et al. 2004, Herlocher et al. 2004, Ives et al. 2002). Daraus wurde geschlussfolgert, dass es diesen Viren nicht möglich ist, Infektionen in der Bevölkerung zu verursachen.

In der Saison 2007/08 breiteten sich von Norwegen ausgehend Oseltamivir-resistente saisonale H1N1-Viren mit der Mutation H275Y in der NA weltweit aus (Hauge et al. 2009, Lackenby et al. 2008, Sheu et al. 2008). Sie führten in der Saison 2008/09 zu einer Resistenz in nahezu allen H1N1-Viren (Moscona 2009). Forschungsergebnisse zeigten, dass zusätzliche NA-Mutationen (R222Q, V234M, D344N) den Fitnessverlust infolge der Resistenzmutation H275Y kompensieren konnten (Abed et al. 2011a, Bloom et al. 2010, Collins et al. 2009, Rameix-Welti et al. 2011). Die A(H1N1)pdm09-Viren verdrängten diese Oseltamivir-resistenten H1N1-Viren (Palese und Wang 2011). In den seither zirkulierenden A(H1N1)pdm09-Viren wurden bisher niedrige Resistenzraten gegen die NAI festgestellt (Hurt et al. 2012, Lackenby et al. 2011, Storms et al. 2012). Der Einfluss von Resistenzmutationen in der NA auf die Fitness dieser Viren ist unklar. Während einige Untersuchungen keinen Unterschied zu sensitiven Viren feststellen konnten (Hamelin et al. 2010, Seibert et al. 2010), zeigten andere einen Fitnessverlust (Brookes et al. 2011, Duan et al. 2010). Die Resistenzraten in den saisonalen H3N2-Viren sind weiterhin gering (Tashiro et al. 2009).

Da sich die NAI in ihrer chemischen Struktur unterscheiden und die verschiedenen NA-Subtypen geringfügige strukturelle Unterschiede aufweisen, sind Resistenzen Substanz- und Subtyp-spezifisch. So führt H275Y in N1-Viren zu einer Oseltamivir-Resistenz (Gubareva et al. 2010, Ferraris und Lina 2008). Aufgrund einer ähnlichen Bindung von Oseltamivir und Peramivir in das aktive Zentrum der NA entsteht durch diese Mutation eine Kreuzresistenz (Hurt et al. 2009). IAV mit H275Y bleiben jedoch empfindlich gegenüber Zanamivir. (Gubareva et al. 2010). In den H3N2-Viren sorgen die Mutationen E119V und R293K für die häufigsten Oseltamivir-Resistenzen (Nguyen et al. 2012a).

Resistenzen gegen Zanamivir und dem strukturell sehr ähnlichen Laninamivir werden in Patientenisolaten nur sehr selten beschrieben, was sich auf die große Ähnlichkeit der Substanzen zum natürlichen Substrat der NA, der Sialinsäure, zurückführen lässt (Abbildung 6). Mutationen würden nicht nur die Bindung von Zanamivir, sondern auch die Bindung der Sialinsäuren beeinträchtigen (McKimm-Breschkin 2013). Generell treten NAI-Resistenzen in Patienten nach prophylaktischer (Baz et al. 2009, Garrison et al. 2009), therapeutischer (Harvala et al. 2010, Inoue et al. 2010, Tramontana et al. 2010) oder ohne eine antivirale Behandlung (Chen et al. 2009, Le et al. 2010) auf. Besonders häufig werden Resistenzen in

Kindern (Whitley et al. 2013) und immunsupprimierten Personen (Baz et al. 2009, Harvala et al. 2010, Tramontana et al. 2010) nach einer NAI-Gabe festgestellt.

Neben Mutationen in der NA wurden auch Substitutionen im HA beobachtet, die die NAI-Empfindlichkeit in der Zellkultur verringern (Blick et al. 1998, McKimm-Breschkin et al. 1996, McKimm-Breschkin et al. 2012, Triana-Baltzer et al. 2009, McKimm-Breschkin et al. 2013). In Gegenwart eines NAI wird die Aktivität der NA reduziert. Aufgrund der gleichbleibenden Bindeaffinität des HA zu den Wirtsrezeptoren wird die NA-HA-Balance gestört, die für eine effektive Replikation sorgt. Durch Mutationen im HA, die wiederum zu einer Senkung der Bindeaffinität führen, kann diese Dysbalance ausgeglichen werden, wodurch eine Replikation auch in Anwesenheit des NAI möglich ist. Da die HA-Mutationen die NAI-Wirkung unspezifisch hemmen, verursachen sie Resistenzen gegenüber allen NAI (Tisdale 2000).

NAI-Empfindlichkeit von H1N1-Viren in vitro und in vivo

Im Rahmen zweier Diplomarbeiten wurde bereits die NAI-Empfindlichkeit von drei A(H1N1)pdm09-Isolaten (Seidel 2011) und dem porzinen *avian-like* H1N1-Virus A/swine/Potsdam/15/81 (Potsdam/15) (Topf 2010) untersucht. Das A(H1N1)pdm09-Virus A/Jena/5258/09 (Jena/5258) unterschied sich von den übrigen A(H1N1)pdm09-Isolaten, da es ohne eine vorherige Adaptation nach der Infektion von BALB/c-Mäusen mit 10^6 TCID₅₀ eine schwere, in zwei Phasen verlaufende Erkrankung verursachte (Seidel 2011). Diese zeichnete sich zunächst durch eine Zunahme der Symptome (Gewichtsabnahme und Verschlechterung des Allgemeinbefindens) bis zum Tag 4 p. i., gefolgt von einer leichten Verbesserung der Krankheitszeichen am Tag 5 p. i. und einer erneuten, starken Symptomzunahme mit Höhepunkt am Tag 7 p. i., aus. Im Gegensatz dazu resultierte die Infektion der Mäuse mit einer Dosis von $4,675 \times 10^5$ TCID₅₀ Potsdam/15 ohne vorherige Anpassung in einer schweren Erkrankung mit einer kontinuierlichen Symptomzunahme bis zu einem Maximum zwischen Tag 6 und 10 p. i. (Topf 2010).

Die Untersuchung von Jena/5258 und Potsdam/15 in einem Enzym-basierten Hemmtest ergab, dass beide Viren gegenüber den NAI Oseltamivir und Zanamivir sensitiv waren (Tabelle 1) (Seidel 2011, Topf 2010). Für die Testung der NAI-Empfindlichkeit im Mausmodell wurde homogenisiertes Lungenmaterial Jena/5258- und Potsdam/15-infizierter Mäuse genutzt, um die Viren auf *Madine Darby Canine Kidney* (MDCK)-Zellen zu vermehren, sodass die Isolate mpJena/5258 und mpPotsdam/15 entstanden. Beide Isolate

erwiesen sich im Enzym-basierten Hemmtest als NAI-sensitiv (Tabelle 1) (Seidel 2011, Topf 2010).

Tabelle 1: Gegenüberstellung der für die Rezeptorbindung verantwortlichen AS und der *In vitro*- und *In vivo*-NAI-Empfindlichkeit von H1N1-Viren

Virusisolat	AS an Position		NAI-Empfindlichkeit <i>in vitro</i> ^a		Oseltamivir-
	HA-187	HA-222	Oseltamivir	Zanamivir	Empfindlichkeit <i>in vivo</i>
Jena/5258	D	D	sensitiv	sensitiv	nicht untersucht
mpJena/5258	D	D	sensitiv	sensitiv	resistent
Potsdam/15	D	G	sensitiv	sensitiv	nicht untersucht
mpPotsdam/15	D	G	sensitiv	sensitiv	sensitiv

^a Die *In vitro*-NAI-Empfindlichkeit wurde in einem Enzym-basierten Hemmtest ermittelt.

^b Für die Untersuchung der *In vivo*-Oseltamivir-Empfindlichkeit wurden weibliche BALB/c-Mäuse infiziert und mit 10 mg/kg/d Oseltamivir über fünf Tage (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, Substanzgabe zweimal täglich) behandelt.

Zusätzlich wurden das HA- und das NA-Gensegment der Ausgangsviren (Jena/5258 bzw. Potsdam/15) und der im antiviralen Versuch eingesetzten Isolate (mpJena/5258 bzw. mpPotsdam/15) sequenziert. In der NA-Sequenz wurden keine bekannten NAI-Resistenzmutationen detektiert (Seidel 2011, Topf 2010). Zudem wurden keine Substitutionen im HA- und NA-Gensegment durch die einmalige Passagierung in der Maus und auf MDCK-Zellen festgestellt (Seidel 2011, Topf 2010).

In den Abbildungen 7 und 8 sind jeweils die Sequenzen des HA und der NA beider Viren bzw. der Mauspassagen gegenübergestellt. Die AS-Abfolgen des HA-Vorläuferproteins besitzen eine Sequenzidentität von 82,7 %. Die Rezeptorbindestelle ist mit Ausnahme der HA-221 und der HA-222, welche gleichzeitig einen Teil der Antigenerkennungsstelle Ca2 darstellen, identisch (vgl. 2.2, Abbildung 8). Die für die Rezeptorspezifität in H1N1-Viren maßgeblich verantwortlichen AS (HA-187 und HA-222) weisen in beiden Sequenzen ein HA-D187 auf, während die HA-222 bei Jena/5258 Asparaginsäure (D) und bei Potsdam/15 Glycin (G) ist (Tabelle 1). Die NA-Sequenz der Viren hat eine Sequenzidentität von 91,7 %. Funktionell und strukturell bedeutende AS zeigen keine Unterschiede (Abbildung 7).

Die *In vivo*-Untersuchungen mit mpJena/5258 und mpPotsdam/15 ergaben, dass eine Behandlung mit 10 mg/kg/d Oseltamivir über 5 Tage (beginnend vier Stunden vor Infektion, Substanzgabe zweimal täglich) keinen Effekt auf BALB/c-Mäuse besaß, die mit 10⁶ TCID₅₀ des Isolats mpJena/5258 infiziert wurden (Seidel 2011), jedoch eine gute Wirkung auf Mäuse

hatte, die mit 10^5 TCID₅₀ des Isolats mpPotsdam/15 infiziert wurden (Topf 2010) (Tabelle 1). Anhand einer stichprobenartigen Sequenzierung der viralen NA in Lungenproben infizierter, Oseltamivir-behandelter Mäuse (am Tag 4 p. i.) konnte die Entstehung von NAI-Resistenzmutationen ausgeschlossen werden.

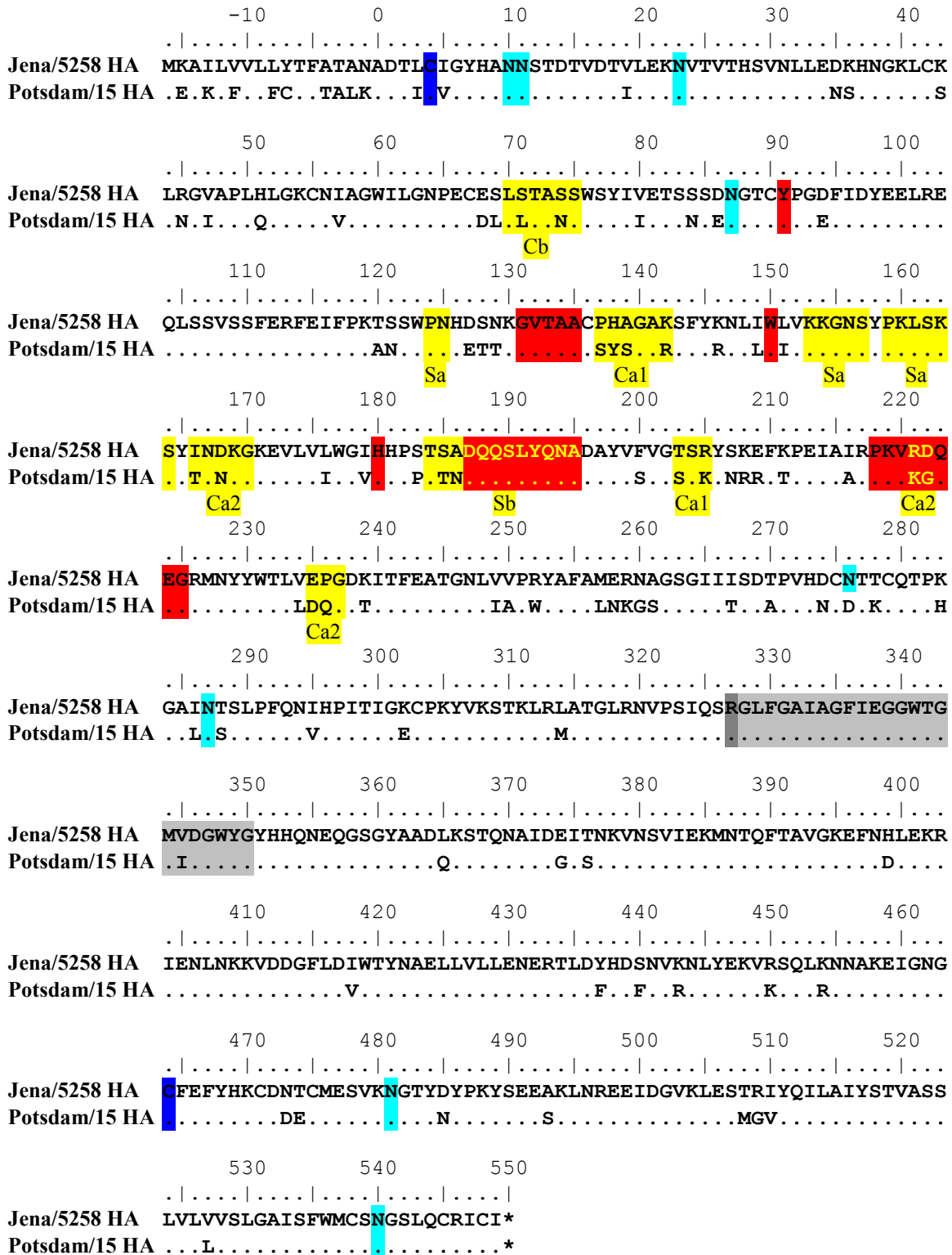


Abbildung 7: Vergleich der AS-Sequenz des HA-Vorläuferproteins von Jena/5258 bzw. mpJena/5258

(GenBank-Nummer KJ549778) und Potsdam/15 bzw. mpPotsdam/15. Die Sequenz beinhaltet das Signalpeptid (AS 16 - 0) sowie die beiden Untereinheiten HA1 (AS 1- 327) und HA2 (AS 328-549). Die AS der Rezeptorbindestelle (rot), der Antigenerkennungsstellen (gelb) und von möglichen Glykosylierungsstellen (hellblau) sind farblich markiert. Zusätzlich sind die monobasische Spaltstelle (dunkelgrau), das Fusionspeptid (hellgrau) und die Cysteine (dunkelblau), zwischen denen im gespaltenen HA eine Disulfidbrücke ausgebildet wird, hervorgehoben.

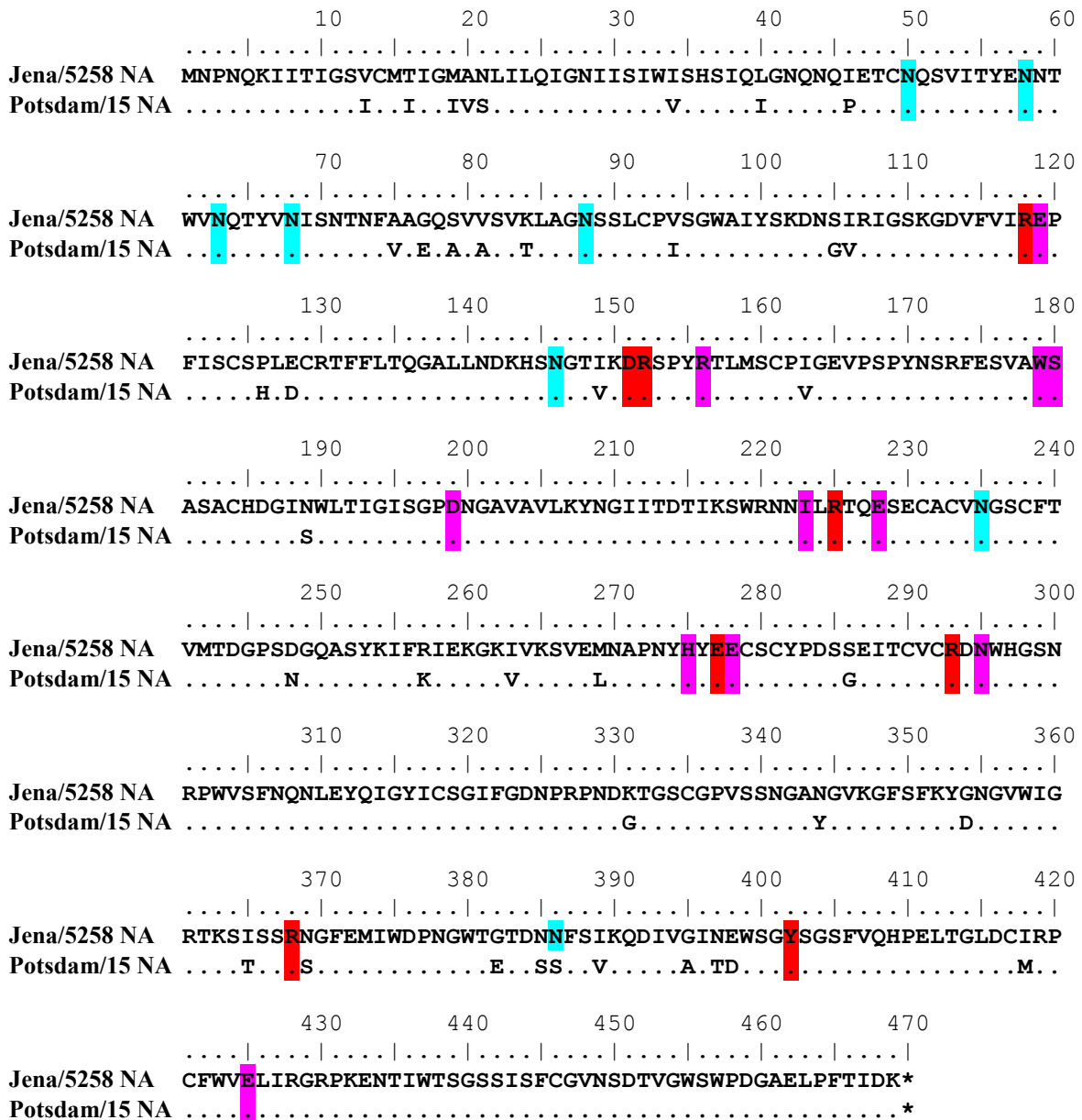


Abbildung 8: Vergleich der AS-Sequenz des NA-Proteins von Jena/5258 bzw. mpJena/5258 (GenBank-Nummer KJ549780) und Potsdam/15 bzw. mpPotsdam/15. Funktionell (rot) und strukturell bedeutende AS (magenta) des aktiven Zentrums sowie mögliche Glykosylierungsstellen (hellblau) sind farblich markiert.

2.5 Zielstellung

Wie in der Einleitung dargelegt, werden die HA-D222G bzw. ein HA-222D/G-Polymorphismus als mögliche Ursache für die unterschiedliche Pathogenität von A(H1N1)pdm09-Viren im Mensch und in der Maus kontrovers diskutiert. Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation bestand darin, die Bedeutung der HA-222-Variabilität für die Pathogenität von H1N1-Viren aufzuklären. Da die HA-222 an der Rezeptorbindung beteiligt ist und somit auch die funktionelle Balance der HA und der NA beeinflussen könnte, sollte weiterhin die Bedeutung von Unterschieden in der HA-222 auf die NAI-Empfindlichkeit dieser Viren untersucht werden.

In vitro galt es die Abhängigkeit der Rezeptorbindung sowie der NAI-Empfindlichkeit von HA-222G/D-Varianten am Beispiel von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 zu prüfen. Dazu sollte (a) die Replikation beider Viren in Zellen mit unterschiedlicher SA α 2,3Gal- und SA α 2,6Gal-Expression sowie (b) die Hämagglutination von Hühner- (SA α 2,3Gal und SA α 2,6Gal) und Schaferythrozyten (SA α 2,3Gal) verglichen werden. Untersuchungen zur Elution der hämagglutinierten Erythrozyten erfolgten, um Hinweise auf die NA-HA-Balance zu erhalten, da letztere die Anti-Influenzavirus-Wirkung von Oseltamivir und Zanamivir in der Zellkultur beeinflussen kann (McKimm-Breschkin et al. 1996). Eine weitere Aufgabe schloss die Feststellung der Wirkung von NAI sowie Ribavirin (Nicht-NAI-Kontrolle) gegenüber beiden Viren in zpE-Hemmtests ein.

In vivo bestand das Ziel durch eine zeitlich engmaschige, vergleichende Analyse verschiedener Untersuchungsparameter im Infektionsverlauf, potenzielle Ursachen für die unterschiedliche Dynamik der Influenza in BALB/c-Mäusen unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der HA-222 für die Pathogenität zu identifizieren. Diese Untersuchungen basierten auf dem Vorwissen, dass mpJena/5258 (HA-D222) eine schwere Influenza mit zwei Krankheitsphasen in BALB/c-Mäusen verursacht, die sich nicht mit 10 mg/kg/d Oseltamivir (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, über 5 Tage verabreicht) behandeln lässt (Seidel 2011). Das Vergleichsvirus mpPotsdam/15 (HA-G222) rief *in vivo* hingegen eine schwere, schnell voranschreitende Influenza hervor, die mit Oseltamivir therapierbar war (Topf 2010). Im Rahmen der Dissertation sollten weibliche BALB/c-Mäuse mit mpJena/5258 bzw. mpPotsdam/15 infiziert und durch eine tägliche Bestimmung des Körpergewichts und des Allgemeinbefindens die Symptomatik bestätigt werden. Die Sektion von mindestens fünf Mäusen täglich vom Tag 1 - 7 p. i. bzw. nachfolgend aller 2 bis 4 Tage bis zum Versuchsende ermöglichte zudem den Vergleich der Virusvermehrung in der Lunge und der Trachea (Titer) sowie die Untersuchung der

Lungenhistopathologie, der Bildung neutralisierender Antikörper und der HA-Sequenz von Virusisolaten aus der Lunge und der Trachea.

Eine weitere *In vivo*-Aufgabenstellung hatte die Klärung der Bedeutung der HA-222 für die Wirkung von NAI zum Ziel. In mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen sollte untersucht werden, ob sich die zuvor festgestellte Nicht-Wirkung von Oseltamivir durch die Verwendung einer niedrigeren Infektionsdosis (10^5 TCID₅₀), einer erhöhten Oseltamivir-Konzentration (100 mg/kg/d) oder einer verlängerten Behandlung (sieben Tage) aufheben lässt. Daneben galt es die Oseltamivir-Empfindlichkeit von mpPotsdam/15 im Mausmodell zu bestätigen, durch eine Erhöhung der Oseltamivir-Konzentrationen (100 mg/kg/d) zu verbessern und die Möglichkeit einer therapeutischen Behandlung (von Tag 2 bis 6 p. i.) auszutesten. Bei diesen Untersuchungen sollte das Nukleosidanalogen Ribavirin, dessen therapeutischer Effekt im Mausmodell gegen IAV in der Literatur beschrieben ist (Khare et al. 1973), als Vergleichssubstanz eingesetzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Antivirale Substanzen

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Substanzen Oseltamivir-Karboxylat sowie Oseltamivir-Phosphat (beide Hoffmann-La-Roche, Basel, CH), welches die inaktive Vorstufe von Oseltamivir-Karboxylat ist, Zanamivir (Glaxo-Smith-Kline, Uxbridge, UK) und Ribavirin (Fährhaus Pharma, Hamburg) eingesetzt.

3.2 Chemikalien und Lösungsmittel

In Tabelle 2 sind die Chemikalien und Lösungsmittel aufgelistet, die zur Herstellung verschiedener Lösungen und Puffer, welche in den folgenden Abschnitten beschrieben werden, verwendet wurden.

Tabelle 2: Chemikalien und Lösungsmittel

Bezeichnung	Herkunft
2-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
Aqua bidest.	Institut für Virologie u. Antivirale Therapie, Jena
Borsäure	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Buchs, CH
EDTA	Serva, Heidelberg
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure (konzentriert)	Carl Roth, Karlsruhe/ Merck, Darmstadt
Ethanol (reinst)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (vergällt)	Nordbrand Nordhausen, Nordhausen
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formalin/Formaldehyd (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe/Merck, Darmstadt
Glycerin (87 %)	Ferak, Berlin
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Kalialaun	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	VEB Laborchemie, Apolda
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumjodat	VEB Laborchemie, Apolda
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bezeichnung	Herkunft
Methanol	Avantor (J. T. Baker) , Deventer, NL
Methylbenzoat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Serva, Heidelberg
Natriumcitrat	VEB Laborchemie, Apolda
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	VEB Laborchemie, Apolda
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Toluol	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.3 Zelllinien und Zellkultivierung

In der vorliegenden Arbeit wurden *Madine Darby Canine Kidney* (MDCK)-Zellen (Friedrich-Löffler-Institut, Riems) und *Madine Darby Bovine Kidney* (MDBK)-Zellen (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau) verwendet. Die Zellen wurden von Herrn Dr. Schacke am Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena passagiert und für die virologischen Tests zur Verfügung gestellt. Für die Passagierung beider Zelllinien wurde *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM; Lonza, Basel, CH) versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS; Gibco[®] by Life technologies, Darmstadt), 2 mM L-Glutamin (Lonza, Basel, CH), 1 mM Natrium-Pyruvat (Lonza, Basel, CH), 1 ml/100 ml NEAA (10-fach konzentriert; Lonza, Basel, CH) sowie 100 U/ml Penicillin und Streptomycin (Lonza, Basel, CH) verwendet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

Zur Durchführung virologischer Tests wurden konfluente *Monolayer* verwendet. Vor der Zugabe der IAV wurden die Zellen einmal mit EMEM gewaschen und anschließend Versuchsmedium bestehend aus EMEM, 2 mM L-Glutamin, 0,1 % Natrium-Bikarbonat (Lonza, Basel, CH), 2 µg/ml Trypsin (Spofa Vereinigte Pharmazeutische Werke, Prag, CZ) oder Tosyl-phenylalanyl-chloromethyl-ke-ton (TPCK)-behandeltes Trypsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sowie 100 U/ml Penicillin und Streptomycin zugegeben.

3.4 Viren und Virusvermehrung

Für die Experimente wurde das A(H1N1)pdm09-Virus A/Jena/5258/09 (Jena/5258) verwendet, welches am Universitätsklinikum Jena von einem 19-jährigen Patienten ohne auffällige Grippe-symptome isoliert und von Herrn Dr. Andi Krumbholz (Institut für Infektionsmedizin, Christian-Albrecht-Universität Kiel und Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, Kiel) zur Verfügung gestellt wurde (Kirchmair et al. 2011). Weiterhin wurde das porcine, *avian-like* H1N1-Virus A/swine/Potsdam/15/81 (Potsdam/15) benutzt, das von Frau Dr. Christina Schrader (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) erhalten wurde (Schrader und Suss 2003, Bauer et al. 2012). Durch die einmalige Passagierung der Viren in der Lunge einer BALB/c-Maus und anschließend in MDCK-Zellen entstanden die Isolate mpJena/5258 bzw. mpPotsdam/15 (Seidel 2011, Topf 2010).

Die Virusvermehrung erfolgte auf konfluenten MDCK-Zellen in einer T₂₅-Zellkulturflasche (Greiner Labortechnik, Frickenhausen). Nach Zugabe von 250 µl Viruslösung und 3 ml Versuchsmedium wurden die Zellen für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, das Infektionsmedium gegen 5 ml neues Versuchsmedium ausgetauscht und die Zellen bis zur Ausbildung eines deutlichen zytopathischen Effektes (zpE) nach 24 bis 48 Stunden im Brutschrank belassen. Anschließend wurde der virushaltige Überstand bei -80 °C zur späteren Verwendung eingefroren.

3.5 Virustiterbestimmung

Der Virustiter wurde mithilfe der 50 %-Endpunkt-Bestimmungsmethode von Reed und Muench (1938) ermittelt und als 50 % Zellkultur-infektiöse Dosis (50% *tissue culture infectious dose*, TCID₅₀) angegeben. Dazu wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe angefertigt und jeweils 50 µl jeder Verdünnungsstufe in vier Vertiefungen einer 96-Well-Platte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) mit konfluenten MDCK-Zellen gegeben, in die bereits 100 µl Versuchsmedium vorgelegt wurde. Nach 4 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 50 µl/Vertiefung Kristallviolett-Formalin-Lösung (100 ml enthalten: 0,25 g Kristallviolett, 0,5 ml vergällten Ethanol, 10,4 ml 37%iges Formalin und 89,1 ml Aqua bidest.) für 24 Stunden gefärbt. Das enthaltene Formalin fixiert die adhären-ten Zellen und inaktiviert noch vorhandene Viruspartikel. Das Kristallviolett dringt in die Zellen ein und färbt die Nukleinsäure-haltigen Bereiche der Zellen an (Wakelin et al. 1981). Anschließend wurde die überständige Lösung abgespült und die Platten getrocknet.

Vertiefungen in denen der Zellrasen geschädigt, also ein zpE entstanden war, wurden als positiv gewertet. Vertiefungen mit komplettem Zellrasen zählten als negativ. Die Berechnung des TCID₅₀-Wertes erfolgte anhand der Publikation von Reed und Muench (1938).

3.6 Plaquereinigung

Die Plaquereinigung diente als Methode, um aus inhomogenen Virusisolaten einzelne Varianten zu isolieren und aufzureinigen. Dazu wurde eine logarithmische Virusverdünnungsreihe im Testmedium angefertigt und jeweils zwei Vertiefungen einer 12-Well-Platte, in der sich konfluente MDCK-Zellen befanden, mit 500 µl jeder Verdünnungsstufe infiziert. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurde das Infektionsmedium gegen jeweils 1 ml Überschichtungsmedium ausgetauscht. Dieses war zu gleichen Teilen aus 0,8 % Agar (gereinigt; Difco Laboratories, Detroit, USA) und doppelt konzentriertem Medium bestehend aus 20 ml/100 ml 10-fach konzentriertem Gibco® *Minimum Essential Medium* (Life technologies, Darmstadt), 80 ml/ 100 ml Aqua bidest., 4 mM L-Glutamin und 0,2 % Natrium-Bikarbonat zusammengesetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für etwa 48 Stunden im Brutschrank. Für die Plaqueisolation wurde eine Virusverdünnung gewählt, in der einzelne, deutlich voneinander abgegrenzte Plaques erkennbar waren. Aus dem Zentrum eines Plaques wurden 10 µl Virussuspension entnommen und damit ein weiterer Plaquetest durchgeführt. Dieser Vorgang wurde noch ein drittes Mal wiederholt. Die Virussuspension aus dem letzten Test wurde zusammen mit 3 ml Versuchsmedium auf konfluente MDCK-Zellen in Petrischalen mit 6 cm Durchmesser (BD Biosciences, Heidelberg) gegeben und bis zur Ausbildung eines deutlichen zpE im Brutschrank inkubiert.

3.7 Replikation auf MDBK- und MDCK-Zellen

Um das Vermehrungsverhalten der Influenzaviren auf Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorexpression einschätzen zu können, wurden konfluente MDBK- und MDCK-Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 TCID₅₀/Zelle infiziert. Dazu wurde auf die Zellen die entsprechende Virusverdünnung gegeben und die Platten eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Infektionsmedium abgenommen und durch dreimaliges Spülen mit EMEM alle ungebundenen Viruspartikel abgewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Testmedium in jede Vertiefung wurden die Platten erneut im Brutschrank inkubiert. Die Entnahme der Zellkulturüberstände erfolgte

eine Stunde, 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion. Diese wurden auf MDCK-Zellen titriert (vgl. 3.4). Der Test wurde zweimal für jedes Virus auf beiden Zelllinien mit jeweils drei Parallelen pro Probezeitpunkt durchgeführt.

3.8 Methoden zur Bestimmung der NAI-Empfindlichkeit *in vitro*

NA-Hemmtest

Der NA-Hemmtest wurde mithilfe des NA-Star® Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Reagent Kits (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Mit diesem Testsystem konnte die Aktivität der viralen NA durch Zugabe des künstlichen Substrats NA-Star®, welches dem natürlichen Substrat, der Sialinsäure, stark ähnelt und des Light Emission Accelerator II als freigesetzte Chemilumineszenz im MLX Microtiter® Plate Luminometer (Dynex Technologies, Berlin) gemessen werden. Durch Zugabe verschiedener NAI-Konzentrationen wurde diejenige Konzentration ermittelt, bei der die NA-Aktivität zu 50 % gehemmt war (IC₅₀).

Vor der Bestimmung von IC₅₀-Werten musste zunächst die NA-Aktivität jedes Virusisolates bestimmt werden. Dazu wurde eine Virusverdünnungsreihe (Faktor 2) in 25 µl MES-Puffer in weißen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) angefertigt. Nach Zugabe von weiteren 25 µl MES-Puffer und 5 µl NA-Star® (20 nM) zu den Testeinheiten wurden die Platten 2 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 55 µl Accelerator in jede Vertiefung, die Messung der Platte im Luminometer und die Ermittlung der NA-Aktivität im Vergleich zu einer virusfreien Kontrolle.

Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden eine halblogarithmische Verdünnungsreihe der NAI Oseltamivir-Karboxylat (im Ergebnisteil nur als Oseltamivir bezeichnet) oder Zanamivir in 25 µl MES-Puffer hergestellt und zu jeder Vertiefung 25 µl einer Virusverdünnung gegeben, die im Vortest einer NA-Aktivität entsprach, welche 40-fach über dem Signal der virusfreien Kontrolle lag. Zusätzlich wurden auf jeder Platte substanzfreie Viruskontrollen mitgeführt. Nach 2-minütigem Schütteln wurden die Platten 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgten die Zugabe von NA-Star® und alle weiteren Schritte wie bereits zur Bestimmung der NA-Aktivität beschrieben. Für die Berechnung der IC₅₀-Werte anhand linearer Interpolation in Microsoft® Excel® wurden die gemessenen Signale der Viruskontrollen gleich 100 % gesetzt und die prozentuale Hemmung der einzelnen Substanzverdünnungen ermittelt. Alternativ wurden die IC₅₀-Werte nach den Empfehlungen der *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) mit dem Programm JASPR (von Dr.

Larisa Gubareva, CDC, zur Verfügung gestellt) berechnet (Okomo-Adhiambo et al. 2010). Alle NAI wurden mit jedem Virus mindestens dreimal unabhängig getestet.

Zytopathischer Effekt (zpE)-Hemmtest

Der zpE-Hemmtest beruht auf der zellzerstörenden Eigenschaft von Influenzaviren, die durch die Zugabe antiviral wirkender Testsubstanzen konzentrationsabhängig verhindert werden kann (Schmidtke et al. 2001). Zur Durchführung des Tests wurde von den Substanzen Oseltamivir-Karboxylat, Zanamivir und Ribavirin eine Verdünnungsreihe (Faktor 2) in Versuchsmedium hergestellt und 50 µl davon auf konfluente MDCK-Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen gegeben. Direkt im Anschluss wurde das gleiche Volumen einer Virusverdünnung zugegeben, die die geringstmögliche MOI aufwies, welche nach 48 Stunden in substanzfreien Kontrollen in einem kompletten zpE resultierte. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Platten mithilfe des Dynatech-Immuno-Assay-System (Dynex Laboratories, Guernsey, UK) automatisiert gefärbt. Dabei wurde jede Vertiefung dreimal mit 100 µl PBS gewaschen, 10 Minuten mit 50 µl einer Kristallviolett-Formalin-Lösung (100 ml enthalten: 0,037 g Kristallviolett, 11,8 ml vergällten Ethanol, 8,2 ml 37%iges Formalin und 80 ml Aqua bidest.) inkubiert und anschließend sechsmal mit 300 µl Aqua bidest. gewaschen. Wenn die Platten getrocknet waren, wurde in jede Vertiefung 100 µl Lysepuffer (100 ml enthalten: 47 ml vergällten Ethanol, 1,95 ml 1N HCl, 51 ml Aqua bidest., 0,89 g Natriumcitrat) gegeben und die Platten für 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert, um den Farbstoff aus den Zellen zu lösen. Anschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte spektrometrisch bei 550/630 nm ebenfalls im Dynatech-Immuno-Assay-System. Auf jeder Platte wurden sechs Viruskontrollen, welche keine Substanz enthielten und sechs Virus- und Substanz-freie Zellkontrollen mitgeführt. Durch das Dynatech-Immuno-Assay-System wurden die gemessenen Werte der Viruskontrollen als *Blank* von allen übrigen Testwerten abgezogen, die Werte der Zellkontrollen als 100 % festgesetzt und die prozentuale antivirale Aktivität der verschiedenen Substanzverdünnungen im Verhältnis dazu ausgegeben. Die Berechnung der IC₅₀ erfolgte im Anschluss mittels Microsoft® Excel®. Alle Substanzen wurden für jedes Virus mindestens dreimal in zwei Parallelen untersucht.

3.9 Hämagglutinationstest

Dieser Test nutzt die durch das HA von Influenzaviren vermittelte Eigenschaft aus, terminale, an Glykoproteine gebundene Sialinsäuren auf der Oberfläche von Erythrozyten zu binden und die Blutzellen damit zu agglutinieren. Zur Bestimmung der Hämagglutinationstiter wurde eine

Virusverdünnungsreihe (Faktor 2, 50 µl Endvolumen) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; 171,1 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 22,7 mM NaH₂PO₄ × 2 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄) in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und V-förmigem Boden (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) hergestellt. Konzentrierte Hühnererythrozyten (25 %; C.C.Pro, Oberdorla) oder defibriniertes Schafblut (C.C.Pro, Oberdorla) wurden dreimal in PBS gewaschen und im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) auf eine optische Dichte (600 nm) von 3,0 eingestellt, was etwa einer 1%igen Lösung entspricht. Anschließend wurde in jede Vertiefung 50 µl der Erythrozytenlösung zugegeben, die Platten 10 Minuten auf dem Schüttler gemischt und dann für eine (Hühnererythrozyten) oder zwei (Schaferythrozyten) Stunden bei 4 °C und danach erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen wurden gewählt, um den Einfluss der temperaturabhängigen NA, die im aktiven Zustand die Sialinssäurereste von den Glykoproteinen abspaltet, auf den Hämagglutinationstiter bestimmen zu können. Zur Auswertung wurden die Platten so lange angekippt bis die Erythrozyten, die sich am Boden der virusfreien Kontrolle abgesetzt hatten, deutlich nach unten gelaufen waren. Als negativ wurden jene Testeinheiten gewertet, die sich wie die virusfreie Kontrolle verhielten. Positive Einheiten zeigten dagegen eine teilweise (abgesetzte Erythrozyten sichtbar, jedoch kein Auslaufen beim Ankippen) oder vollständige Agglutination der Blutzellen. Als Hämagglutinationstiter wurde der Reziprokwert der höchsten Virusverdünnung angegeben, bei der eine Agglutination sichtbar war. Die niedrigste getestete Virusverdünnung war 1 : 10.

3.10 Lektinfärbung auf MDBK- und MDCK-Zellen

Zur Bestimmung der Verteilung von SAα2,3Gal und SAα2,6Gal auf der Oberfläche von MDBK- und MDCK-Zellen wurden die Zellen auf Nunc[™] Lab-Tek[™] II Chamber Slide[™] 8-Feld-Objekträgern (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) ausgesät, bis zur Konfluenz kultiviert und mit -20 °C kaltem Methanol für 10 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS erfolgte die Lektinfärbung mit dem DIG Glycan Differentiation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) wie vom Hersteller beschrieben. Für die Markierung von SAα2,3Gal wurde das *Maackia amurensis*-Agglutinin (MAA) und für SAα2,6Gal das *Sambucus nigra*-Agglutinin, welche beide im Kit enthalten sind, verwendet. Für die Farbreaktion wurden die Chromogene aus dem Dako REAL[™] Detection System APAAP Mouse (Dako, Glostrup, DK) entsprechend den Herstellerangaben gemischt und auf die vorbehandelten Zellen gegeben. Nach etwa zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farblösung abgenommen und die

Zellen dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern mit NOVA Mount (Dianova, Hamburg) unter Deckgläsern fixiert. Nach der Trocknung erfolgten die lichtmikroskopischen Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Jena) und einer Fotokamera Contax 167 MT (Kyocera, Kyoto, J). Die Bilder wurden mit dem Programm Axio Vision 4.8.1 (Carl Zeiss, Jena) bearbeitet.

3.11 Charakterisierung des Infektionsverlaufs von Influenza-A-Viren und Untersuchung der Wirksamkeit von Oseltamivir-Phosphat und Ribavirin *in vivo*

Stellungnahme zur Ethik

Alle in der Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden gemäß den Regelungen des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Für die Versuche lag eine Genehmigung durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz unter den Registriernummern 02-049/11 und 02-032/12 vor.

Allgemeine Haltungsbedingungen

Die Tierversuche wurden an 16 bis 18 g schweren, weiblichen BALB/c-Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld) unter S2-Bedingungen in der Tierversuchseinheit 3 des Tierhauses 5 (Universitätsklinikum Jena) durchgeführt. Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in Versuchsgruppen (drei bis fünf Tieren) eingeteilt und in einzeln belüfteten Käfigen gehalten. Sie hatten Zugang zu ssniff® R/M-Haltungsfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und angesäuertem Wasser *ad libidum*. Die Temperatur betrug 22 ± 2 °C und die relative Luftfeuchte 55 ± 10 %. Zudem herrschte ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Nach Ankunft der Mäuse in der Tierversuchseinheit wurden sie durch Ohrlochmarkierungen gekennzeichnet und hatten dann 4 bis 6 Tage Zeit, um sich an die Haltungsbedingungen zu gewöhnen.

Infektion

Die Infektion der Mäuse erfolgte unter einer leichten Isofluran (DeltaSelect, München)-Narkose (Bantia et al. 2011). Den Mäusen wurde je 20 µl Viruslösung verdünnt in EMEM intranasal verabreicht. Kontrolltiere wurden mit 20 µl EMEM scheininfiziert.

Gewichtskontrolle und Einschätzung des Allgemeinbefindens

Nach Beginn der Versuche und während der Akutphase der Infektion wurden täglich das Körpergewicht der Mäuse gemessen und das Allgemeinbefinden mithilfe eines klinischen Scores, der in Tabelle 3 beschrieben ist, anhand äußerer Merkmale und des Verhaltens der Tiere bewertet. Später erfolgten die Gewichtsmessung und die Einschätzung des Allgemeinbefindens zwei- bis dreitägig. Mäuse die während des Versuchs mehr als 25 % ihres Ausgangsgewichts (Versuchsbeginn) verloren hatten bzw. schwere Krankheitserscheinungen zeigten, wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen abgetötet.

Tabelle 3: Bewertungskriterien und zugeordneter klinischer Score zur Einschätzung des Allgemeinbefindens der Mäuse

klinischer Score	optische Merkmale und Verhalten der Maus
0	keine Veränderung
1	struppiges Nackenfell
2	struppiges Nacken- und Rückenfell
3	struppiges Fell, beginnende Buckelausbildung
4	sehr struppiges Fell, deutlicher Buckel, beginnende Inaktivität, Augen teilweise geschlossen
5	sehr struppiges Fell, starker Buckel, deutliche Inaktivität, Augen meist geschlossen
6	sehr struppiges Fell, starker Buckel, vollkommene Inaktivität, Augen geschlossen
7	verstorben oder wegen Gewichtsabnahme > 25% abgetötet

Sektion

Für die Sektion wurden die Mäuse nach Ablauf der Versuchszeit mit Diethylether (Otto Fische, Saarbrücken) betäubt und unter Äthernarkose durch Entbluten aus der Axillararterie getötet. Das Blut wurde am Ende der Sektion 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, das überständige Serum abpipettiert und zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Weiterhin erfolgte die aseptische Entnahme der Lunge und der Trachea. Das Gesamtgewicht der Lunge wurde gemessen. Anschließend wurde der linke Lungenflügel in 3,7%ige Formalinlösung gegeben, um nach der Fixierung für die histologischen Untersuchungen verwendet zu werden. Der obere rechte Lungenflügel wurde ebenso wie der untere Teil der Trachea gewogen, in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren. Für eine spätere RNA-Isolierung wurden der Kehlkopf zusammen mit dem oberen Teil der

Trachea sowie der zweitgrößte, rechte Lungenflügel für 24 Stunden bei 4 °C in RNAlater® *Stabilization Solution* (Ambion® by Life technologies, Darmstadt) konserviert und nach Abnahme der Lösung ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Tierversuche zur Charakterisierung des Infektionsverlaufs von Influenza-A-Viren

In jeweils einem separaten Tierversuchsexperiment wurde der Infektionsverlauf der bereits einmalig in einer Mauslunge und auf MDCK-Zellen passagierten Virusisolate mpJena/5258 und mpPotsdam/15 untersucht. Pro Versuch wurden 60 Mäuse mit 10^6 TCID₅₀/Maus des Isolats mpJena/5258 oder mit 10^4 TCID₅₀/Maus des Isolats mpPotsdam/15 infiziert sowie neun Kontrolltiere scheininfiziert. Das Gewicht und das Allgemeinbefinden der Mäuse wurde bis zum Tag 12 (mpJena/5258) oder 11 p. i. (mpPotsdam/15) täglich protokolliert. Während des Versuchs wurden ständig Mäuse seziert, die vor Versuchsbeginn festgelegt wurden oder die mehr als 25 % ihres Ausgangsgewichts verloren hatten. Die Anzahl der seziierten Mäuse ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die bei den Sektionen erhaltenen Seren dienten zur Bestimmung des Antikörpertiters. Die entnommenen Lungen und Tracheen wurden zur Untersuchung des Virustiters in beiden Organen, der Bestimmung des Lungengewichtes im Verhältnis zum Gesamtgewicht der Maus, der Beurteilung der histopathologischen Veränderungen in den Lungen und teilweise zur Sequenzierung des HA der darin enthaltenen Virusisolate genutzt.

Tabelle 4: Anzahl der mpJena/5258-, mpPotsdam/15- und scheininfizierten Mäuse, die an den verschiedenen Versuchstagen zur Charakterisierung des Infektionsverlaufs seziert wurden

Infektion (Dosis/Maus)	Anzahl seziierte Mäuse am jeweiligen Tag p. i. (n =)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mpJena/5258 ^a (10^6 TCID ₅₀)	5	5	5	5	5	10 ^b	10 ^b	0	6	0	0	6
scheininfiziert	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
mpPotsdam/15 (10^4 TCID ₅₀)	5	5	5	5	21 ^b	6 ^b	9 ^b	0	0	0	4	-
scheininfiziert	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	3	-

^a Drei Mäuse verstarben infolge der Infektion vor der Sektion.

^b Die Mäuse wurden aufgrund eines Gewichtsverlustes von über 25 % ihres Ausgangsgewichts an dem entsprechenden Tag abgetötet.

Tierversuche zur Testung der Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin

Die Wirksamkeit von Oseltamivir gegen die Virusisolate mpJena/5258, mpPotsdam/15 und HA-G222-mpJena/5258 wurden im Mausmodell untersucht. Dazu wurde Oseltamivir-Phosphat verwendet, welches im Organismus in das aktive Metabolit Oseltamivir-Karboxylat

umgewandelt wird. Zusätzlich wurde die *In vivo*-Wirkung von Ribavirin getestet. Die in den einzelnen Versuchen eingesetzten Infektionsdosen, der Behandlungszeitraum und die applizierten Substanzdosen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Beide Substanzen wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und mittels einer Schlundsonde zweimal täglich oral verabreicht. Die erste Substanzgabe erfolgte vier Stunden vor Infektion der Mäuse (prophylaktisch) oder am Morgen des angegebenen Tages (therapeutisch). Zur Einschätzung des Behandlungserfolgs wurde in jedem Versuch eine virusinfizierte Placebo-Gruppe mitgeführt, der über den angegebenen Zeitraum (Tabelle 5) 0,9%ige NaCl-Lösung oral verabreicht wurde. Zudem beinhaltete jeder Versuch eine scheininfizierte Kontrollgruppe, die ebenfalls 0,9%ige NaCl-Lösung oral erhielt.

Tabelle 5: Übersicht der Tierversuche zur Untersuchung der Wirkung von Oseltamivir-Phosphat und Ribavirin in mpJena/5258-, HA-G222-mpJena/5258- und mpPotsdam/15-infizierten Mäusen

Infektion (Dosis/Maus)	Behandlung	Gesamt- anzahl ^a (n =)	Anzahl sezierter Mäuse (n =)	
			d4 p. i.	d21 p. i.
mpJena/5258 (10 ⁵ TCID ₅₀)	10 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 0 - 4 p. i.	14	5	5
	Placebo, Tag 0 - 4 p. i.	15	5	6
scheininfiziert	Placebo, Tag 0 - 4 p. i.	6	3	3
mpJena/5258 (10 ⁶ TCID ₅₀)	100 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 0 - 4 p. i.	14	4	7
	100 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 0 - 6 p. i.	15	5	5
	100 mg/kg/d Ribavirin, Tag 0 - 4 p. i.	15	5	10
	Placebo, Tag 0 - 6 p. i.	15	5	4
scheininfiziert	Placebo, Tag 0 - 6 p. i.	6	3	3
HA-G222- mpJena/5258 (10 ⁶ TCID ₅₀)	10 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 0 - 4 p. i.	15	5	6
	75 mg/kg/d Ribavirin, Tag 0 - 4 p. i.	10	5	5
	Placebo, Tag 0 - 4 p. i.	15	5	3
scheininfiziert	Placebo, Tag 0 - 4 p. i.	6	3	3
HA-G222- mpJena/5258 (10 ⁶ TCID ₅₀)	100 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 2 - 6 p. i.	15	5	3
	75 mg/kg/d Ribavirin, Tag 0 - 4 p. i.	5	0	5
	Placebo, Tag 2 - 6 p. i.	15	5	1
scheininfiziert	Placebo, Tag 0 - 6 p. i.	5	2	3

Infektion (Dosis/Maus)	Behandlung	Gesamt- anzahl ^a (n =)	Anzahl sezierter Mäuse (n =)	
			d4 p. i.	d21 p. i.
mpPotsdam/15 (10 ⁴ TCID ₅₀)	10 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 0 - 4 p. i.	15	5	0
	100 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 0 - 4 p. i.	15	5	2
	75 mg/kg/d Ribavirin, Tag 0 - 4 p. i.	10	5	5
	Placebo, Tag 0 - 4 p. i.	15	5	0
scheininfiziert	Placebo, Tag 0 - 4 p. i.	6	3	3
mpPotsdam/15 (10 ⁴ TCID ₅₀)	100 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 0 - 6 p. i.	14	5	4
	100 mg/kg/d Oseltamivir, Tag 2 - 6 p. i.	15	5	4
	75 mg/kg/d Ribavirin, Tag 0 - 4 p. i.	5	0	5
	Placebo, Tag 0 - 6 p. i.	15	5	0
scheininfiziert	Placebo, Tag 0 - 6 p. i.	6	3	3

^a Gesamtanzahl der Mäuse, die in einem Versuch infiziert oder scheininfiziert und gleich behandelt wurden.

Mortalität, Körpergewicht und Allgemeinbefinden der Mäuse wurden bis zum Tag 21 p. i. protokolliert. Tiere, die einen Gewichtsverlust von über 25 % ihres Ausgangsgewichts aufwiesen, wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen abgetötet und als verstorben (klinischer Score = 7) gewertet. Am Tag 4 p. i. erfolgte die Sektion von fünf infizierten (Ausnahme Ribavirin, siehe Tabelle 5) sowie drei scheininfizierten Mäusen pro Gruppe (Tabelle 5). Alle infizierten Tiere, die bis zum Tag 21 p. i. überlebten, wurden an diesem Tag seziert. Anhand der gewonnenen Daten sollten Aussagen über den Einfluss der Substanzen auf das Lungengewicht, den Virustiter in der Lunge und der Trachea sowie zu histopathologischen Veränderungen der Lunge gemacht werden. Weiterhin wurde die mittlere Überlebenszeit ermittelt. Dazu wurde die Überlebensdauer aller Mäuse einer Gruppe gemittelt. Für verstorbene Tiere wurde der Todestag und für überlebende Tiere der letzte Versuchstag (> Tag 21) als Wert benutzt. Die Tiere, die am Tag 4 p. i. seziert wurden, wurden nicht in den Abbildungen und Tabellen zu Mortalität, mittlerer Überlebenszeit, Körpergewicht und Allgemeinbefinden berücksichtigt.

3.12 Organaufarbeitung zur Virustiterbestimmung

Vor der Lungen- und Trachea-Virustiterbestimmung galt es das Organmaterial zu homogenisieren. Nach dem Auftauen der Proben wurden die einzelnen Lungenstücke mithilfe von je einer 5 mm Stahlkugel in der Schwingmühle MM300 (Retsch, Haan) für 3 Minuten bei

30 Schlägen/Sekunde zu einer 10%igen Organlösung in EMEM-Versuchsmedium zerrieben. Auf gleiche Weise wurde mit den Tracheen verfahren, jedoch wurde aus ihnen eine 2%ige Organlösung hergestellt. Die so erhaltenen Homogenate wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Vor der Virustiterbestimmung wurden die Organlösungen aufgetaut und eine Minute bei 3000 rpm zentrifugiert, sodass nur der Überstand für die Titration verwendet wurde, die, wie unter 3.4 beschrieben, erfolgte.

3.13 Histologie

Die histologischen Lungenschnitte wurden von Birgit Meißner (Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena) angefertigt. Die für mindestens 24 Stunden in 3,7%iger Formalinlösung fixierten Lungenproben wurden nach zweistündiger Inkubation in Leitungswasser mithilfe des Shandon Citadel® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie in Methylbenzoat und Toluol entwässert und gehärtet. Die so vorbehandelten Organe wurden anschließend unter Benutzung des Shandon Histocentre 2 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) in Thermo Shandon Histo Plast Paraffin (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) eingebettet. Mit dem Mikrotom Jung SM 2000R (Leica Biosystems, Nussloch) wurden 6 µm dicke Lungenschnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht. Nach der Trocknung folgte die Entparaffinierung der Schnitte durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe. Nach dem Spülen in Aqua dest. schloss sich die Hämatoxylin-Eosin-Färbung an. Dazu wurden die Schnitte zuerst in einer Hämatoxylinlösung (100 ml enthalten: 0,1 g Hämatoxylin, 0,02 g Kaliumjodat, 5 g Kalialaun, 0,1 g Zitronensäure, 5 g Chloralhydrat), dann in Leitungswasser und schließlich in Eosinlösung (0,5 g Eosin in 100 ml Aqua dest verdünnt) inkubiert. Es folgte das Spülen in Aqua dest. sowie die Inkubation in einer aufsteigen Alkoholreihe und in Xylol. Die so gefärbten Schnitte wurden abschließend mit Shandon EZ Mount™ (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) unter Deckgläsern fixiert.

Die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte anhand eines histopathologischen Scores (Tabelle 6). Veränderte Lungenbereiche zeichneten sich durch das Auftreten von Hämorrhagien, Ödemen und durch Infiltrationen von Immunzellen aus.

Tabelle 6: Bewertungskriterien und zugeordneter histopathologischer Score für die Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Lungenschnitte

histopathologischer Score	Bewertung der Präparate
0	keine histopathologischen Veränderungen
0,5	< 5 % der Lungenschnitte histopathologisch verändert
1	5 bis 25 % der Lungenschnitte histopathologisch verändert
2	25 bis 50 % der Lungenschnitte histopathologisch verändert
3	50 bis 75 % der Lungenschnitte histopathologisch verändert
4	75 bis 100 % der Lungenschnitte histopathologisch verändert

3.14 Bestimmung der Antikörpertiter

Mithilfe des Neutralisationstests wurden die bei der Sektion gewonnenen Seren auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper gegen ein bestimmtes Virus untersucht. Zunächst wurden die Seren 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert. Es folgte die Herstellung einer Serumverdünnungsreihe (Faktor 2) in EMEM-Versuchsmedium in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen und die Zugabe des gleichen Volumens einer Virusverdünnung (25 µl), die 100 TCID₅₀ enthielt. Um diese herzustellen, musste der Titer des Virus zuvor, wie unter 3.4 beschrieben, bestimmt werden. Es erfolgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurde das Virus-Serum-Gemisch auf konfluente MDCK-Zellen in 96-Well-Platten gegeben, die zuvor mit EMEM gespült und mit 100 µl EMEM-Versuchsmedium vorbereitet wurden. Zur Kontrolle der eingesetzten Virusverdünnung wurde eine Virustitration ohne Serumvorbehandlung in jedem Versuch mitgeführt. Die Zellen wurden für vier Tage im Brutschrank inkubiert und im Anschluss mit Kristallviolett-Formalin-Lösung gefärbt. Als Neutralisationstiter wurde das Reziproke der höchsten Serumverdünnung angegeben, die die Zellen vor einem virusinduzierten zpE schützte. Die niedrigste eingesetzte Serumverdünnung war 1 : 20.

3.15 Primer

Die in Tabelle 7 aufgelisteten Primer wurden wie angegeben für die cDNA-Synthese, die Fragmentamplifikation (PCR) und die Sequenzierreaktion (Sequenz) der untersuchten Viren eingesetzt.

Tabelle 7: Verwendete Primer

Bezeichnung	Nukleotidsequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
<u>alle IAV-Gensegmente:</u>		
Uni 12 ^a	AGCAAAAGCAGG	cDNA-Synthese
<u>Gensegment 1(PB2):</u>		
Ba-PB2-1 ^a	TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC	PCR, Sequenz
PB2-R1 ^b	CTTTCCAYCATGTATGCCACCAT	PCR, Sequenz
PB2-F2b ^b	TGTTATCATGGAGGTCGTTTTCCC	PCR, Sequenz
PB2-R2 ^b	CTGTTCTGTCTCTYCCACTTACTAT	PCR, Sequenz
PB2-F3 ^b	CACTTTCAAAGAACAAGYGGATC	PCR, Sequenz
PB2-F4 ^b	CGAATATTCCAGYACTGAGAGAGTGG	PCR, Sequenz
Ba-PB2-2341R ^a	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT	PCR, Sequenz
<u>Gensegment 2 (PB1):</u>		
Bm-PB1-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA	PCR, Sequenz
PB1-pand-R1 ^b	TGAAAGAAATCTCTGTGTCTTGTG	PCR, Sequenz
PB1-pand-F2 ^b	CGAAAAGCTTGAACAGTCTGGGC	PCR, Sequenz
PB1-pand-R2 ^b	TTGTATTCCCTCATGGTTTGGTGC	PCR, Sequenz
PB1-F3 ^b	GAATCTTGGGCAAAGAGATACAC	PCR, Sequenz
Bm-PB1-2341R ^a	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT	PCR, Sequenz
<u>Gensegment 3 (PA):</u>		
PB1-PA-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC	PCR, Sequenz
PA-R1 ^b	TTCAAGGCTGGAGAAGTTCGG	PCR, Sequenz
PA-F2 ^b	TCCTTTCGTCAAGTCCGA	PCR, Sequenz
PA-F2a	GTTCTGCTGATGGATGCTCTG	Sequenz
PA-pand-R2 ^b	ATCTTCTCCTATTTTCATCAAGTTC	PCR, Sequenz
PA-F3b ^b	AACAGTATGACAGTGAYGAGCC	PCR, Sequenz
Bm-PA-2233R ^a	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT	PCR, Sequenz
<u>Gensegment 4 (HA):</u>		
Bm-HA-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	PCR, Sequenz
Panning-H1-R ^b	GAGGACATGCTGCCGTTACACC	Sequenz
RKI-H1-F238 ^b	GGAAATCCAGAGTGTGAATCACTC	PCR, Sequenz
HAH1-R9a ^b	TGGACATTTTCCAATTGTGATCGG	PCR, Sequenz
HAH1-F7a ^b	CAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAC	PCR, Sequenz
HAH1-R10 ^b	CTGGCGACAGTTGAATAGATCGCC	Sequenz
HAH1-	GGAATACCACGATTCAAATGTG	Sequenz
3'Ende(H1N1v) ^b		
HAH1-R3 ^b	TGGGATGTACGTTCTGAAAAGGAAG	PCR, Sequenz

Bezeichnung	Nukleotidsequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
HAH1-R3a	CATGGGGGGTTTGGCACTTTGTATC	PCR, Sequenz
HAH1-R3b	GGGGCATTCTCCAATAGTGATGGG	PCR, Sequenz
HAH1-F4 ^b	AGCCACTGGGAACCTTAATAGCACC	PCR, Sequenz
HAH1-F3 ^b	GAAAGCTGACACCATYTGTGTAGG	Sequenz
HAH1-345F	TGAGGAATTAAGGGAGCAGCTGAG	Sequenz
HAH1-1419R	CAACCATTCCCGATTTCTTTGGCA	Sequenz
HAH1-3'-4 ^b	GATTTCCATGACTTTAACGTAAG	Sequenz
HAH1-5'-1 ^b	CTGGGTGCCAAGGATCCATCCTG	Sequenz
Bm-NS-890R ^{a,c}	ATATCGTCTAGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	PCR, Sequenz
<u>Gensegment 5 (NP):</u>		
Bm-NP-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA	PCR, Sequenz
NP-pand-R1 ^b	AAATGAGGTCTTCAATCTCAGCGTT	PCR, Sequenz
NP-pand-F2 ^b	ATGATCAAACGTGGAATCAATGAC	PCR, Sequenz
NP-F1a	GGATGAGAGAACTCATCCTTTATG	Sequenz
NP-F2a	GTGGATGGCATGCCACTCTGCTGC	Sequenz
Bm-NP-1565R ^a	ATATCGTCTAGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT	PCR, Sequenz
<u>Gensegment 6 (NA):</u>		
Ba-NA-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	PCR, Sequenz
NAN1-5'-1 ^b	ATRTCTTTACTGTATATAGCCC	Sequenz
NAN1-F1 ^b	TTGGAAACATAATCTCAATATGG	Sequenz
NAN1-R802	CGACTGATTTGACTATCTTTCCC	PCR, Sequenz
NAN1-F2 ^b	CGACTGATTTGACTATCTTTCCC	PCR, Sequenz
NAN1-R2 ^b	GCACCGTCTGGCCAAGACCAACC	Sequenz
NAN1-3'-1 ^b	GGGAGTTTTGTTCAGCATCCAG	Sequenz
NAN1-F104	GCCACTCAATTCAACTTGGG	Sequenz
NAN1-R1 ^b	GCCCATTACTTGGTCCATCGGTC	PCR, Sequenz
NAN1-318F	GCCCTATTAGTGGGTGGGC	Sequenz
NAN1-1003R	GGGCGCGGATTGTCTCCG	Sequenz
Ba-NA-1413R ^a	ATATCGTCTAGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	PCR, Sequenz
<u>Gensegment 7 (M)</u>		
Bm-M-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	PCR, Sequenz
Bm-M-1027R ^a	ATATCGTCTAGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	PCR, Sequenz
<u>Gensegment 8 (NS)</u>		
Bm-NS-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG	PCR, Sequenz
NS-pand-447f	GGCTTTCACTGAGGAGGGAGC	Sequenz
Bm-NS-890R ^{a,c}	ATATCGTCTAGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	PCR, Sequenz

- ^a Die Primer wurden anhand der Publikation von Hoffmann et al. (2001) synthetisiert.
- ^b Die Primer wurden von Prof. Roland Zell (Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena) zur Verfügung gestellt.
- ^c Die Sequenz für den reversen Primer am 5'-Ende des HA-Gensegments ist identisch mit dem reversen Primer am 5'-Ende des NS-Gensegments.

3.16 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus Überständen virusinfizierter MDCK-Zellen, aus Organen, welche mit RNAlater® *Stabilization Solution* behandelt wurden oder aus homogenisiertem Organmaterial virusinfizierter Mäuse erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden). 50 bis 100 µl des virushaltigen Materials wurden mit 350 µl RLT-Puffer gemischt, welcher zuvor mit 10 µl/ml 2-Mercaptoethanol versetzt wurde. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das lysierte Material auf eine QIAshredder™-Säule (Qiagen, Hilden) gegeben. Die weitere RNA-Isolation erfolgte wie vom Hersteller angegeben. Die erhaltene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

c-DNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA aus der viralen RNA wurde entweder das Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilden) oder die Maxima H Minus Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) zusammen mit dem Primer Uni 12 (Tabelle 7) eingesetzt, welcher spezifisch für alle IAV-Gensegmente ist. Bei der cDNA-Synthese mit dem Omniscript® RT Kit wurden 7 µl RNA-Lösung, 1 µl 10x Puffer, 1 µl dNTP-Mix (5 mM), 0,5 µl Primer Uni 12 (20 µM) und 0,5 µl Omniscript® RT gemischt und im Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) eine Stunde bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer fünf-minütigen Denaturierung bei 93 °C.

Für die cDNA-Synthese mithilfe der Maxima H Minus Reverse Transkriptase wurden zunächst 10 µl RNA-Lösung mit 1 µl Primer Uni 12 (10 µM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM; Thermo Fisher Scientific, Dreieich) und 2,5 µl Aqua bidest. vermischt und 5 Minuten bei 65 °C in einem Thermoblock (Liebisch Labortechnik, Bielefeld) inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden zu jeder Probe 4 µl 5x RT-Puffer, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl; Thermo Fisher Scientific, Dreieich) und 1 µl Maxima H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl) gegeben. Die Synthesereaktion erfolgte für 30 Minuten bei 50 °C, gefolgt von einer fünf-minütigen Denaturierung bei 85 °C im Thermoblock. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.17 Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein einfaches und schnelles *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung von DNA-Fragmenten. Mithilfe ausgewählter Primerpaare und einer hitzestabilen Polymerase können durch zyklische Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation eine Vielzahl von Kopien eines DNA-Fragmentes erstellt werden. Die Temperaturen und die Dauer der einzelnen Schritte hängen von der Wahl der Primer und der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab.

Die Amplifikation der verschiedenen DNA-Fragmente erfolgte mit dem Taq Core Kit 10 (MP Biomedicals, Illkirch, F) in Kombination mit einem ausgewählten Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Tabelle 7). Standardmäßig bestand ein Reaktionsansatz aus 38,75 µl DEPC-Wasser (1 ml DEPC/1000 ml Aqua bidest), 5 µl 10x Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), je 2 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 µM), 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und 1 µl cDNA. Wurde die RNA zuvor aus homogenisierten Organen gewonnen, so wurden in der PCR 2 µl der daraus hergestellten cDNA und entsprechend nur 37,75 µl DEPC-Wasser eingesetzt. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Mastercycler[®] gradient:

A) 1 Zyklus	Denaturierung:	5 Minuten bei 94 °C
B) 38 Zyklen	Denaturierung:	30 Sekunden bei 94 °C
	Primer-Annealing:	50 Sekunden bei 55 °C
	Elongation:	60 Sekunden bei 72 °C
C) 1 Zyklus	Elongation:	10 Minuten bei 72 °C

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung, ob in der PCR das gewünschte Fragment amplifiziert wurde, wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Weiterhin konnte so beurteilt werden, welche Reinigungsmethode der PCR-Produkte notwendig war. Die Gelelektrophorese beruht darauf, dass sich die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode bewegt. Die Geschwindigkeit wird von der Porengröße des Gels, die mit der gewählten Agarosekonzentration beeinflussbar ist und der Fragmentgröße bestimmt, wobei kleine Fragmente sich schneller durch das Gel bewegen als größere. Somit ist eine Auftrennung der DNA-Fragmente anhand ihrer Größe möglich.

Für die Elektrophorese wurde aus 1x TBE-Puffer (100 ml enthalten: 5,4 g TRIS, 2,75 g Borsäure, 0,465 g EDTA, pH 8,0) und LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) ein

1,2%iges Agarosegel, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, hergestellt. In jede Geltasche wurden 2 µl PCR-Ansatz gemischt mit 2 µl DNA-Ladepuffer (100 µl enthalten: 239,5 mg Bromphenolblau, 33 ml Glycerin 87 %, 67 ml 10 mM EDTA, pH 8,0) und 10 µl Aqua bidest. gegeben und bei einer Spannung von 80 bis 110 V in 1 × TBE-Puffer aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden im Geldokumentationsgerät G:Box (Syngene, Cambridge, UK) unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Die Größenzuordnung der Fragmente erfolgte anhand des 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt/Main), der in jedem Gel mitgeführt wurde.

3.18 Aufreinigung von PCR-Fragmenten und Sequenzierung

PCR- und Gelreinigung

Um die DNA-Fragmente für die weitere Verwendung von Rückständen der PCR zu reinigen, wurde anhand des Ergebnisses der Agarose-Gelelektrophorese die entsprechende Aufreinigungsmethode gewählt. War im Gel nur eine Bande sichtbar, wurde das DNA-Fragment aus dem PCR-Ansatz mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Waren im Gel jedoch mehrere Banden unterschiedlicher Größe sichtbar, so wurde der komplette PCR-Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt, die Bande, die die richtige Fragmentgröße aufwies, aus dem Gel ausgeschnitten und das DNA-Fragment mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben gereinigt.

Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) verwendet. Dabei werden in die entstehenden PCR-Amplifikate an zufälliger Stelle ddNTP eingebaut, was eine weitere Verlängerung verhindert. Dies geschah unter Verwendung des GenomeLab™ DTCS-Quick Start Kits (Beckman Coulter, Krefeld) und jeweils eines geeigneten Primers aus Tabelle 7. Für die Reaktion wurden 4 µl Sequenziermix, 1 µl Primer (10 µM) und 5 µl des gereinigten DNA-Fragments gemischt und im Mastercycler® gradient unter folgenden Bedingungen inkubiert:

30 Zyklen:	Denaturierung:	20 Sekunden bei 96 °C
	Primer-Annealing:	50 Sekunden bei 55 °C
	Elongation:	3 Minuten bei 60 °C

Es folgte die Aufreinigung der Proben, um Rückstände der Sequenzierreaktion zu entfernen. Dazu wurde zu jeder Probe eine Fällungslösung bestehend aus 2 µl 3 M Natriumacetat (16,7

ml konzentrierte Essigsäure, mit 10 M NaOH auf pH 5,2 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt), 2 µl 100 mM EDTA (pH 8,0) und 1 µl Glykogen (20 mg/ml) sowie 60 µl 100%iger Ethanol pipettiert und 20 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die überständige Lösung wurde entfernt, das entstandene Pellet in 60 µl 80%igem Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 30 °C in der Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 30 µl GenomeLab™ Sample Loading Solution gelöst und mithilfe des CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systems (Beckman Coulter, Krefeld) analysiert. Die Ermittlung der Sequenzen erfolgt über die schrittweise Detektion der in die Nukleinsäureketten eingebauten fluoreszenzmarkierten ddNTP. Die Auswahl der zur Auswertung geeigneten Sequenzabschnitte wurde mit dem CEQ™ 8000 Genetic Analysis System vorgenommen. Zur abschließenden Sequenzauswertung wurde das Programm Bio Edit 7.2.0 verwendet.

3.19 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft® Excel® 2007 und IBM® SPSS Statistics 21. Microsoft® Excel® 2007 wurde zur Berechnung der Mittelwerte sowie der zugehörigen Standardabweichungen genutzt. Alle statistischen Tests wurden mit IBM® SPSS Statistics 21 durchgeführt. Normalverteilte, numerische Daten (Virustiter, Körpergewichte, Lungengewichte, Antikörpertiter, mittlere Überlebenszeit) wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben untersucht, sofern nur zwei Datensätze verglichen werden sollten. War die Bedingung der Varianzgleichheit nicht erfüllt, wurde ein Welch-Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Datensätzen wurde eine einfaktorielle ANOVA (*Analysis of Variance*) angewendet und zur paarweisen Analyse der Tukey-HSD-Post-hoc-Test eingesetzt. Sollten nur zwei nicht normalverteilte oder ordinal skalierte Datensätze (klinischer Score, histopathologischer Score) verglichen werden, so wurde der Mann-Whitney-U-Test benutzt. Die Analyse von mehr als zwei Datensätzen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test mit angeschlossenen Dunn's-Post-hoc-Test.

Zur graphischen Darstellung der Mortalität in den Tierversuchen wurde die Kaplan-Meier-Darstellung (IBM® SPSS Statistics 21) gewählt. Die Signifikanzanalyse wurde mit dem Log-Rank-Test und einem angeschlossenen Gehan-Breslow-Wilcoxon-Post-hoc-Test für den paarweisen Vergleich durchgeführt. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt. Signifikanzwerte im Bereich von $0,1 > p > 0,05$ wurden als leichte, aber nicht signifikante Wirkung eingeschätzt, während für Werte von $p > 0,1$ kein Wirkeffekt mehr angenommen wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Replikation, Rezeptorbindung und NAI-Empfindlichkeit von H1N1-Viren mit HA-D222 und HA-G222 *in vitro*

Das A(H1N1)pdm09-Virus mpJena/5258 und das porcine, *avian-like* H1N1-Virus mpPotsdam/15 besitzen ein HA-D222 bzw. ein HA-G222 und unterscheiden sich im Krankheitsverlauf sowie der NAI-Empfindlichkeit in BALB/c-Mäusen (Abbildung 7, Tabelle 1) (Seidel 2011, Topf 2010). Deshalb wurden diese Isolate für die Untersuchungen zum Einfluss der HA-222 auf die Pathogenität und die NAI-Empfindlichkeit *in vitro* und *in vivo* ausgewählt.

Vor den *In vivo*-Untersuchungen wurde zunächst von beiden Viren die Replikation in Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorexpression, die Rezeptorbindung im Hämagglutinationstest mit Erythrozyten von verschiedenen Spezies und die Empfindlichkeit gegenüber den NAI Oseltamivir und Zanamivir sowie gegen das Nukleosidanalogon Ribavirin in MDCK-Zellen analysiert.

4.1.1 Replikation von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 in Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorexpression

Die Untersuchung der Replikation von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 erfolgte auf MDCK- und MDBK-Zellen, die sich in der Rezeptorexpression unterschieden. Mithilfe einer Lektinfärbung konnte gezeigt werden, dass die verwendeten MDCK-Zellen sowohl SA α 2,3Gal als auch SA α 2,6Gal auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abbildung 9A). Im Gegensatz dazu wiesen die MDBK-Zellen fast ausschließlich SA α 2,3Gal auf (Abbildung 9B). Die stärkere Färbung der MDCK-Zellen, verglichen mit den MDBK-Zellen, deutete zusätzlich auf eine höhere Expression an IAV-spezifischen Rezeptoren hin.

Ein Vergleich des Virusertrags von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 ergab 24 und 48 Stunden nach Infektion mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle signifikant höhere Virustiter für mpJena/5258 in MDCK-Zellen (Abbildung 10A). Dagegen konnten in MDBK-Zellen 8, 24 und 48 Stunden nach der Infektion signifikant höhere mpPotsdam/15-Titer und für mpJena/5258 nur eine sehr geringe Replikation festgestellt werden (Abbildung 10B). Diese Ergebnisse zeigten, dass mpJena/5258 effizienter in Zellen mit SA α 2,6Gal- und SA α 2,3Gal-Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche repliziert. Im Unterschied dazu vermehrt sich mpPotsdam/15 sehr gut in Zellen, in denen SA α 2,3Gal dominiert.

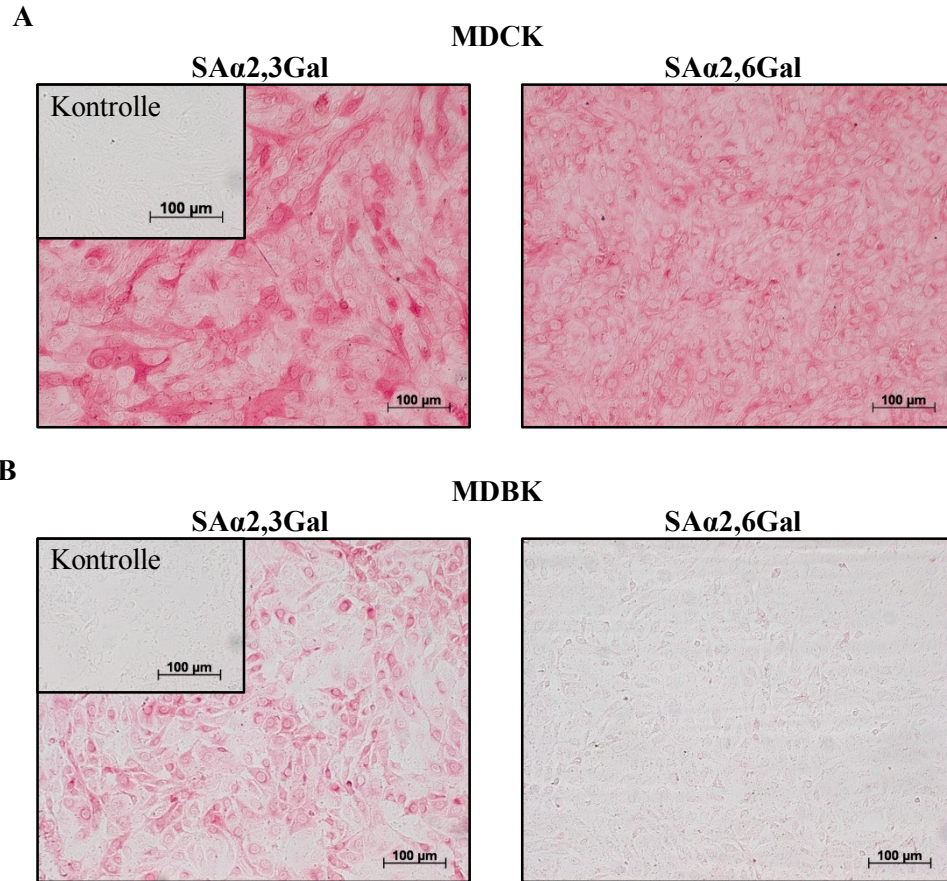
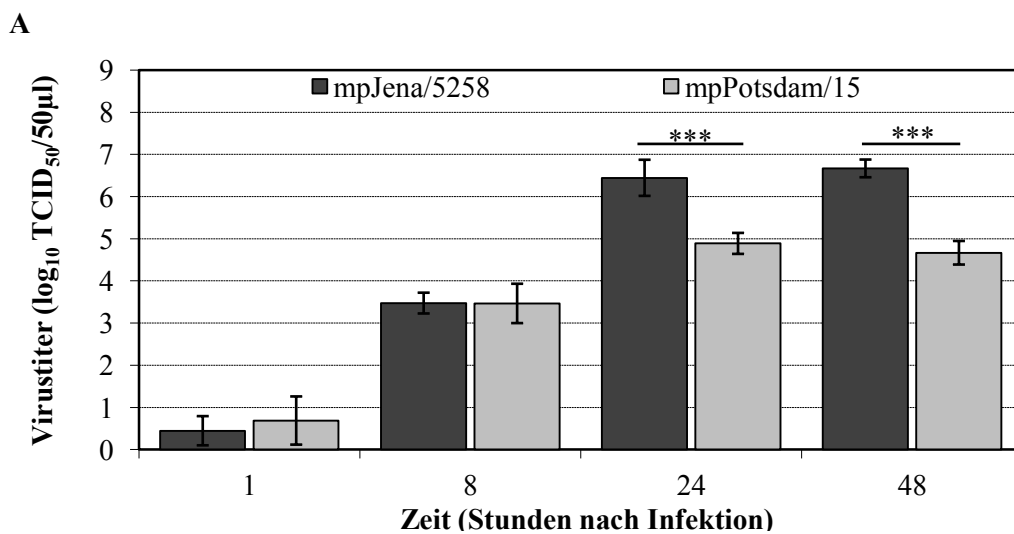


Abbildung 9: Nachweis der IAV-spezifischen Oberflächenrezeptoren SA α 2,3Gal und SA α 2,6Gal auf (A) MDCK- und (B) MDBK-Zellen mittels Lektinfärbung. Für den Nachweis wurden das SA α 2,3Gal-spezifische MAA und das SA α 2,6Gal-spezifische SNA aus dem DIG Glycan Differentiation Kit verwendet.



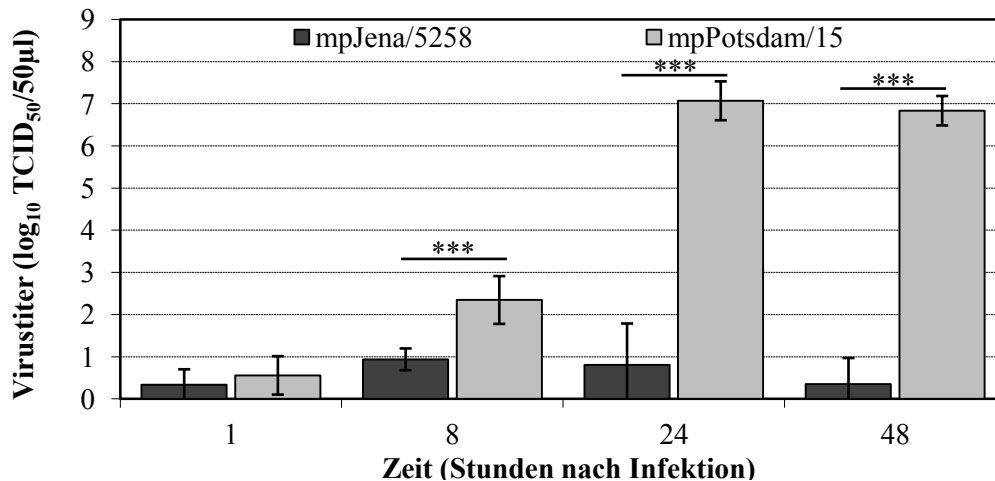
B

Abbildung 10: Replikation von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 in (A) MDCK- und (B) MDBK-Zellen. Dargestellt sind der mittlere Virustiter und die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Versuchen mit je drei Parallelen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. *** $p < 0,001$

4.1.2 Hämagglutination unterschiedlicher Erythrozyten durch mpJena/5258 und mpPotsdam/15

Um die Rezeptorbindung eingehender zu untersuchen, wurde ein Hämagglutinationstest mit den Ausgangsviren und den einmal Maus-passagierten Viren unter Verwendung von Hühner- und Schaferythrozyten durchgeführt. Hühnererythrozyten weisen auf ihrer Oberfläche SA α 2,3Gal und SA α 2,6Gal auf, wobei SA α 2,3Gal stärker exprimiert werden (Medeiros et al. 2001). Im Gegensatz dazu besitzen Schaferythrozyten nur SA α 2,3Gal (Medeiros et al. 2001). Alle untersuchten Viren hämagglutinierten die Hühnererythrozyten bei 4 °C (Tabelle 8). Durch die enzymatische Aktivität der viralen NA bei 37 °C konnten Jena/5258 und mpJena/5258 innerhalb einer Stunde wieder vollständig von den Hühnererythrozyten eluieren, jedoch nicht Potsdam/15 und mpPotsdam/15. Eine Hämagglutination der Schaferythrozyten erfolgte nur durch Potsdam/15 und mpPotsdam/15. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C war nur eine minimale Elution über eine Verdünnungsstufe zu beobachten.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass das HA von Jena/5258 und mpJena/5258 stärker an SA α 2,6Gal als an SA α 2,3Gal bindet, wobei unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Bindung an SA α 2,3Gal gezeigt werden konnte. Die Elution dieser Viren von den Hühnererythrozyten bei 37 °C wies auf eine gute NA-HA-Balance in diesem Testsystem hin, da die NA jene Rezeptoren abspaltete, die zuvor durch das HA erkannt wurden.

Tabelle 8: Bindung und Elution von Hühner- und Schaferythrozyten durch die Ausgangsviren und die Maus-passagierten Viren

Virusisolat	Hämagglutinationstiter			
	Hühnererythrozyten		Schaferythrozyten	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
Jena/5258	80	< 10	< 10	< 10
mpJena/5258	80	< 10	< 10	< 10
Potsdam/15	160	160	160	80
mpPotsdam/15	320	320	320	160

Die Hämagglutination der Schaferythrozyten durch Potsdam/15 und mpPotsdam/15 demonstrierte eine starke Bindung des HA an SA α 2,3Gal. Da diese Viren auch die Hühnererythrozyten hämagglutinierten, ist neben der Bindung an SA α 2,3Gal von einer Bindung an SA α 2,6Gal auszugehen. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Hämagglutination der Hühnererythrozyten nur auf die Bindung an SA α 2,3Gal zurückzuführen war. Die nicht vorhandene Elution von beiden Erythrozytenspezies deutete auf eine schlechte funktionelle Balance zwischen HA und NA in den Testsystemen hin.

4.1.3 NAI- und Ribavirin-Empfindlichkeit von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 in MDCK-Zellen

Der Nachweis der NAI-Empfindlichkeit von Influenzaviren in Zell-basierten Tests hängt vom Vorliegen einer NA-HA-Balance ab (McKimm-Breschkin et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels zpE-Hemmtests in MDCK-Zellen (SA α 2,3Gal und SA α 2,6Gal) die Aktivität von Oseltamivir und Zanamivir gegenüber mpJena/5258 und mpPotsdam/15 sowie den jeweiligen Ausgangsviren überprüft. Hierbei diente das Nukleosidanalogen Ribavirin, dessen Aktivität nicht von der NA-HA-Balance abhängt, als Kontrollsubstanz.

Alle Viren erwiesen sich im nanomolaren Bereich als NAI-empfindlich (Tabelle 9). Ribavirin hemmte den zpE aller getesteten Viren im hohen mikromolaren Bereich (Tabelle 9).

Tabelle 9: NAI- und Ribavirin-Empfindlichkeit in einem Zell-basierten zpE-Hemmtest

Virus	IC ₅₀ zpE-Hemmtest		
	Oseltamivir (nM)	Zanamivir (nM)	Ribavirin (µM)
Jena/5258	15,59 ± 9,35	14,41 ± 9,75	68,54 ± 24,86
mpJena/5258	21,51 ± 18,58	29,03 ± 20,53	67,56 ± 65,72
Potsdam/15	5,34 ± 2,41	7,03 ± 2,96	158,42 ± 51,08
mpPotsdam/15	4,00 ± 1,73	4,18 ± 1,31	137,47 ± 64,65

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Replikation in MDCK- und MDBK-Zellen sowie der Hämagglutination von Hühner- und Schaferythrozyten bewiesen, dass mpJena/5258 hauptsächlich SAα2,6Gal als Rezeptoren erkennt, während mpPotsdam/15 stark an SAα2,3Gal bindet (Tabelle 10).

Für beide Viren wurde die Oseltamivir- und Zanamivir-Empfindlichkeit im MDCK-Zell-basierten zpE-Hemmtest bestätigt (Tabelle 10). Die Vergleichssubstanz Ribavirin wirkte in diesem Test deutlich schlechter als die NAI (Tabelle 10).

Mit den Ausgangsviren (Jena/5258 und Potsdam/15) wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Tabelle 10: Zusammenfassung der *In vitro*-Eigenschaften von mpJena/5258 und mpPotsdam/15

Virusisolat	HA-222	Replikation in Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorexpression		Hämagglutination bei 4 °C in Erythrozyten von		Empfindlichkeit gegenüber	
		MDCK	MDBK	Hühnern	Schafen	NAI	Riba-
		(SAα2,3Gal + SAα2,6Gal)	(SAα2,3Gal)	(SAα2,3Gal + SAα2,6Gal)	(SAα2,3Gal)		virin
mpJena/5258	D	+++	+/-	++	-	+++	+/-
mpPotsdam/15	G	++	+++	+++	+++	+++	+/-

4.2 Einfluss von HA-222D/G auf den Infektionsverlaufs von H1N1-Viren *in vivo*

4.2.1 Unterschiede im Verlauf der mpJena/5258- und mpPotsdam/15-Infektion in BALB/c-Mäusen

Um den Einfluss der HA-222-Variabilität auf die Pathogenität in BALB/c-Mäusen genauer zu untersuchen, wurden BALB/c-Mäuse mit den Viren mpJena/5258 und mpPotsdam/15 infiziert

und täglich der Gewichtsverlust sowie das Allgemeinbefinden über 12 bzw. 11 Tage p. i. festgestellt. Die Erkrankung der mpJena/5258-infizierten Mäuse verlief in der Mehrzahl der Tiere zweiphasig. Die Tiere nahmen bis zum Tag 4 p. i. ca. 17 % ihres Ausgangsgewichtes ab. Nach einer kurzen Stagnation am Tag 5 p. i. kam es zu einer weiteren 5%igen Gewichtsabnahme bis zum Tag 7 p. i. (Abbildung 11A). Die Verschlechterung des Allgemeinbefindens der infizierten Mäuse verlief fast synchron (Abbildung 11B). Der klinische Score stieg zunächst bis zum Tag 4 p. i. an, stagnierte am Tag 5 p. i. und erreichte am Tag 7 p. i. sein Maximum. Die mpPotsdam/15-infizierten Mäuse zeigten eine kontinuierliche Gewichtsabnahme um ca. 23 % und eine konstante Verschlechterung des Allgemeinbefindens bis zum Tag 7 p. i. (Abbildung 12A und B). Die überlebenden Tiere (sechs mpJena/5258- und vier mpPotsdam/15-infizierte) beider Versuche erholten sich bis zum Experimentende am Tag 11 oder 12 p. i. fast vollständig.

Während der Experimente sollten täglich fünf vor Versuchsbeginn festgelegte Mäuse seziert werden, um den Infektionsverlauf anhand weiterer Parameter wie Virustiter in der Lunge und der Trachea sowie histopathologische Veränderungen der Lunge zu charakterisieren. Die Infektion mit beiden Viren führte jedoch zu einem starken Gewichtsverlust, der in einigen Tieren über 25 % des Ausgangsgewichts betrug. Deshalb wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen am Tag 5 (mpPotsdam/15), 6 und 7 p. i. (beide Viren) mehr als die vorgesehenen fünf Mäuse abgetötet (siehe 3.11; Tabelle 4) und zu späteren Versuchszeitpunkten konnte aufgrund der geringeren verbleibenden Tieranzahl nicht mehr täglich seziert werden. Weiterhin starben nach der mpJena/5258-Infektion drei Mäuse vorzeitig.

Eine Betrachtung der individuellen Verläufe von Gewicht und Allgemeinbefinden ergab, dass die am Tag 6 und 7 p. i. wegen zu hoher Gewichtsabnahme abgetöteten mpJena/5258-infizierten Mäuse überwiegend eine konstante Verschlechterung der Symptome aufwiesen (Seidel et al. 2014). Im Gegensatz dazu zeigten fast alle verbliebenen Tiere einen deutlichen biphasischen Krankheitsverlauf, wie zuvor für Jena/5258 festgestellt (Manchanda et al. 2014). Einen weiteren wichtigen Parameter zur Einschätzung der Pathogenität beider Viren stellte der Virustiter in der Lunge und der Trachea dar, da er Auskunft über die Dauer und das Ausmaß der Virusreplikation lieferte. Der in zwei Phasen verlaufenden Verschlechterung der Krankheitssymptome in den mpJena/5258-infizierten Mäusen gingen jeweils hohe Lungen- und Tracheatiter voraus (Abbildung 11C). Jedoch war der Titer in der Lunge in der ersten Phase der Erkrankung am Tag 2 p. i. etwa 45-fach höher als in der Trachea, während in der späten Phase am Tag 6 p. i. der Tracheatiter 13-fach über dem der Lunge lag. Dies wies auf einen veränderten Organotropismus hin.

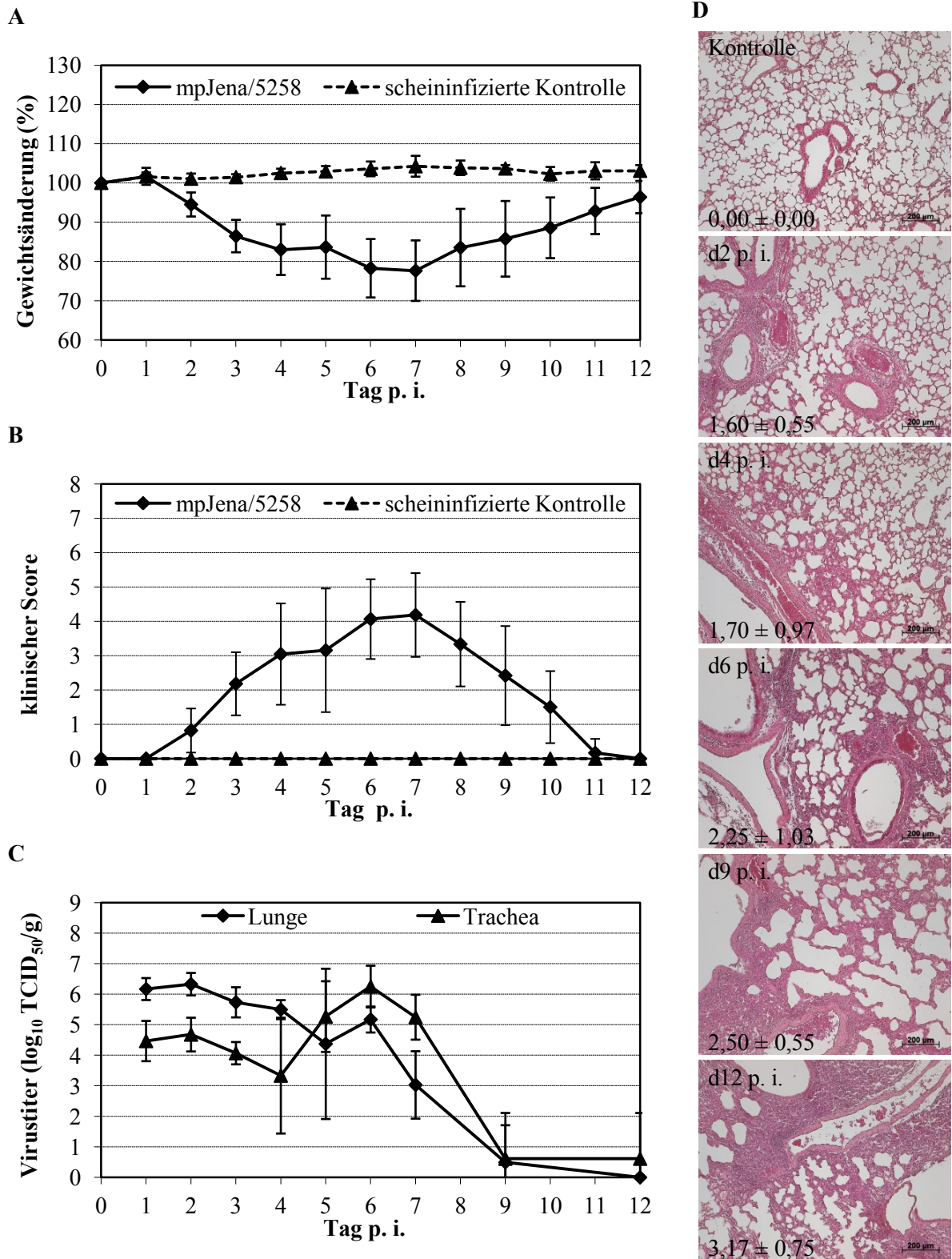
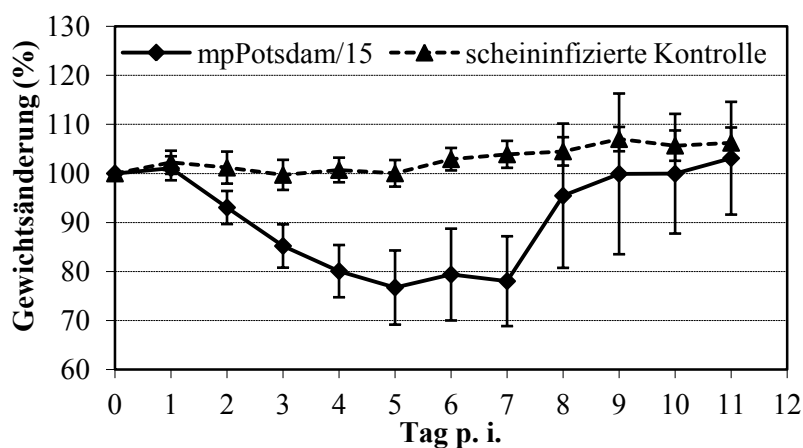


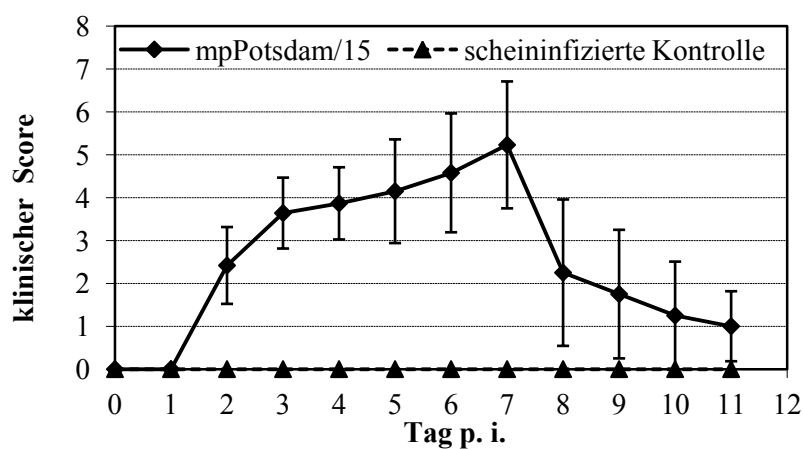
Abbildung 11: Infektionsverlauf in mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen. (A) Die Körpergewichtsänderung und (B) das Allgemeinbefinden (klinischer Score) von mpJena/5258-infizierten Mäusen (10^6 TCID₅₀) und scheininfizierten Kontrolltieren wurde bis zum Tag 12 p. i. täglich dokumentiert. Das Körpergewicht wurde prozentual im Verhältnis zum Ausgangsgewicht der Mäuse am Tag 0 angegeben. (C) Der Virustiter in der Lunge und der Trachea wurde für mpJena/5258-infizierte Mäuse ermittelt, die an den Tagen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 und 12 p. i. seziiert wurden. (D)

Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Lungenschnitte zeigen die histopathologischen Veränderungen, die durch die Virusreplikation in den infizierten Mäusen an den Tagen 2, 4, 6, 9 und 12 p. i. verursacht wurden im Vergleich zu einer scheininfizierten Kontrolle. Der Mittelwert und die resultierende Standardabweichung des histopathologischen Scores aller Mäuse, die am jeweiligen Tag seziert wurden, sind angegeben.

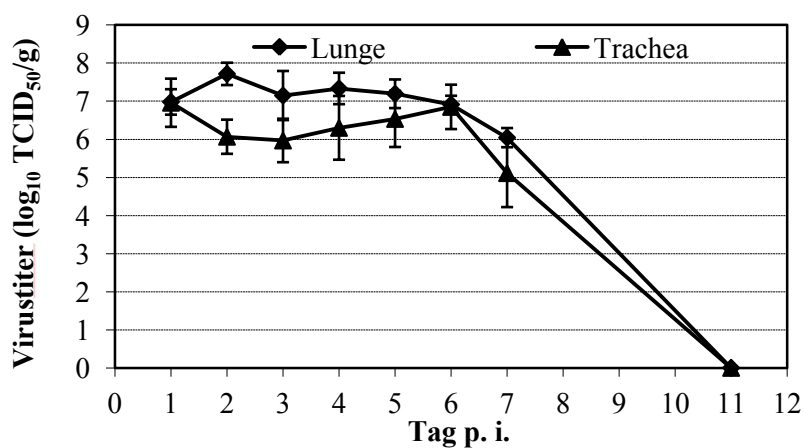
A



B



C



D

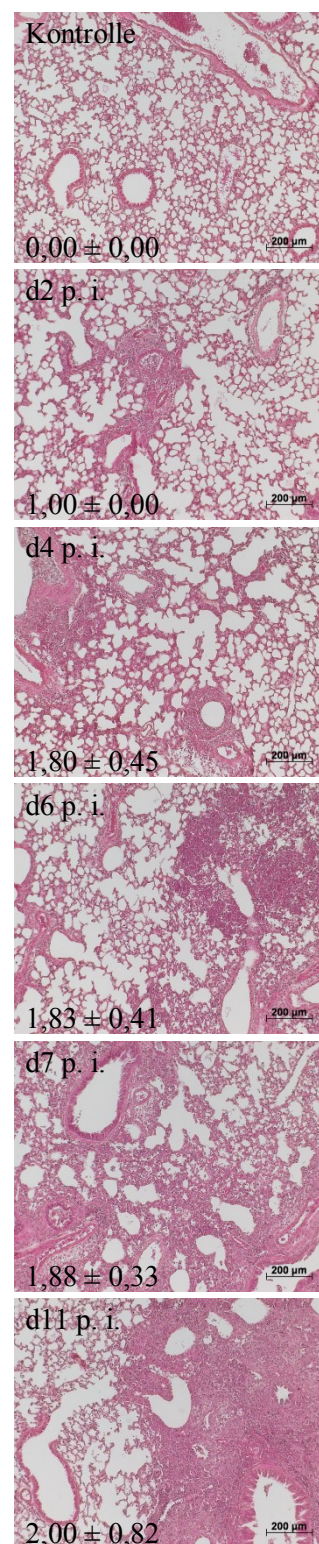


Abbildung 12: Infektionsverlauf in mpPotsdam/15-infizierten BALB/c-Mäusen. (A) Die Körpergewichtsänderung und (B) das Allgemeinbefinden (klinischer Score) von mpPotsdam/15-infizierten Mäusen (10^4 TCID₅₀) und scheininfizierten Kontrolltieren wurde bis zum Tag 11 p. i. täglich dokumentiert. Das Körpergewicht wurde prozentual im Verhältnis zum Ausgangsgewicht der Mäuse am Tag 0 angegeben. (C) Der Virustiter in der Lunge und der Trachea wurde für mpPotsdam/15-infizierte Mäuse ermittelt, die an den Tagen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 11 p. i. seziiert wurden. (D) Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Lungenschnitte zeigen die histopathologischen Veränderungen, die durch die Virusreplikation in den infizierten Mäusen an den Tagen 2, 4, 6, 7 und 11 p. i. verursacht wurden im Vergleich zu einer scheininfizierten Kontrolle. Der Mittelwert und die resultierende Standardabweichung des histopathologischen Scores aller Mäuse, die am jeweiligen Tag seziiert wurden, sind angegeben.

In der Lunge von mpPotsdam/15-infizierten Mäusen schwankte der mittlere Virustiter von Tag 1 bis 6 p. i. zwischen etwa 10^7 und 10^8 TCID₅₀/g (maximaler Titer am Tag 2 p. i.; Abbildung 12 C). Die Untersuchung des Tracheatiters ergab an diesen Tagen ebenfalls hohe Werte zwischen 10^6 und 10^7 TCID₅₀/g. Erst am Tag 7 p. i. sanken die Titer in beiden Organen deutlich. Weiterhin ergab der Vergleich der Titer beider Viren, dass trotz einer 100-fach geringeren Infektionsdosis in den mpPotsdam/15 (10^4 TCID₅₀)-infizierten Mäusen etwa 25-fach höhere Werte in der Lunge und 4-fach höhere Werte in der Trachea erreicht wurden (Abbildung 11C und 12C). Somit replizierte mpPotsdam/15 im Respirationstrakt von BALB/c-Mäusen besser als mpJena/5258. Damit korrelierte eine stärkere Pathogenität, was ein signifikant höherer maximaler klinische Score von 5,23 für mpPotsdam/15-infizierte Mäuse im Vergleich zu 4,18 für mpJena/5258-infizierte Mäuse am Tag 7 p. i. zeigte ($p = 0,04$; Abbildung 11B und 12B). Auch die Gewichtsabnahme spiegelte dies wider. Während 21 der verbliebenen 40 (52,5 %) mpPotsdam/15-infizierten Tiere am Tag 5 p. i. bereits mehr als 25 % ihres Ausgangsgewichtes verloren hatten, war dies bei 10 von 32 (31,3 %) verbliebenen mpJena/5258-infizierten Tieren erst am Tag 6 p. i. der Fall.

Die von beiden Viren verursachten histopathologischen Veränderungen in den Lungenschnitten infizierter Mäuse ähnelten sich (Abbildung 11D und 12D). Am Tag 2 p. i. ließen sich zunächst nur lokal begrenzte Immunzellinfiltrate um die Bronchien und Bronchiolen erkennen. In den folgenden Tagen nahm die Anzahl der Infiltrate zu und es erfolgte eine Ausbreitung in das umgebende alveoläre Gewebe. Neben der großflächigen Einwanderung von Immunzellen in das Lungengewebe waren auch Hämorrhagien und Ödeme erkennbar. Obwohl am Tag 11 bzw. 12 p. i. keine infektiösen Viren mehr in der

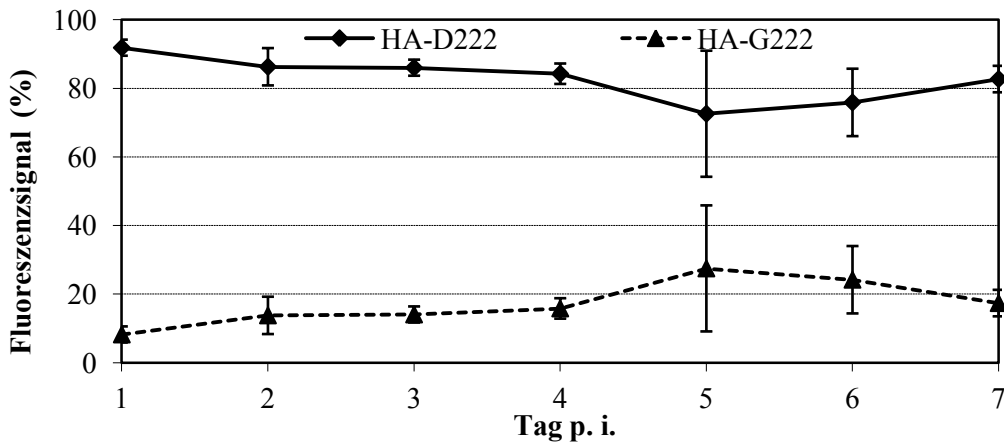
Lunge nachweisbar waren, zeigte sich noch keine Regeneration der konsolidierten Lungenbereiche.

4.2.2 Ein HA-222D/G-Polymorphismus verursacht den unterschiedlichen Infektionsverlauf in mpJena/5258- und mpPotsdam/15-infizierten BALB/c-Mäusen

Das HA ist für die Bindung des Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle verantwortlich (Palese und Shaw 2007). Substitutionen innerhalb dieses Proteins ermöglichen eine Anpassung an die Wirtsrezeptoren (Stevens et al. 2006). Dies könnte die Änderung des Organotropismus in mpJena/5258-infizierten Mäusen erklären. Aus diesem Grund wurde das HA aus Lungen- und Tracheahomogenaten von je drei zufällig ausgewählten mpJena/5258-infizierten Mäusen, die am Tag 1 und 5 p. i. seziert wurden, komplett sequenziert. Vergleichend dazu wurde das HA aus Lungen- und Tracheaprobe von je drei zufällig ausgewählten mpPotsdam/15-infizierten Mäusen von Tag 1 und 5 p. i. analysiert. Die Auswertung der Sequenzen ergab, dass alle untersuchten Organproben mpJena/5258-infizierter Mäuse einen HA-222D/G-Polymorphismus aufwiesen (Abbildung 13B und 14B), der jedoch nicht in der Sequenz des für die Infektion genutzten Virus mpJena/5258 zu erkennen war. Der Polymorphismus geht auf die Überlappung eines Adenin- und eines Guaninsignals in der zweiten Position des für die HA-222 kodierenden Triplets (G A/G T) im Sequenzchromatogramm zurück, wodurch eine HA-D222- und eine HA-G222-Variante von mpJena/5258 nachgewiesen wurde. Weiterhin zeigte die Sequenzierung, dass die HA-D222-Variante in der Lunge und der Trachea am Tag 1 p. i. sowie in der Lunge am Tag 5 p. i. überwog, während in der Trachea am Tag 5 p. i. die HA-G222-Variante dominant war (Abbildung 13B und 14B). Es wurden keine anderen HA-Sequenzunterschiede zwischen den Organproben mpJena/5258-infizierter Mäuse untereinander und im Vergleich zum Virus, welches zur Infektion genutzt wurde, festgestellt.

Die Untersuchung der Proben mpPotsdam/15-infizierter Mäuse ergab keine Veränderungen im Vergleich zum Infektionsvirus (Ergebnisse nicht dargestellt), weshalb für dieses Virus keine weiteren Sequenzanalysen durchgeführt wurden.

A



B

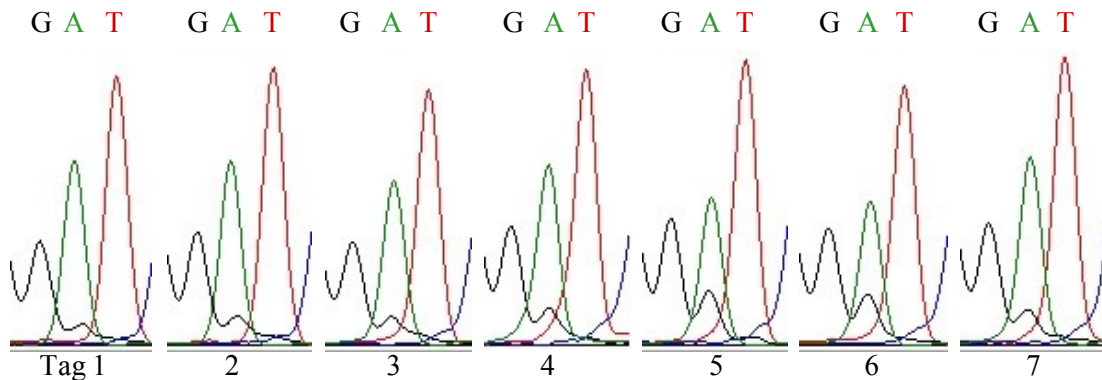
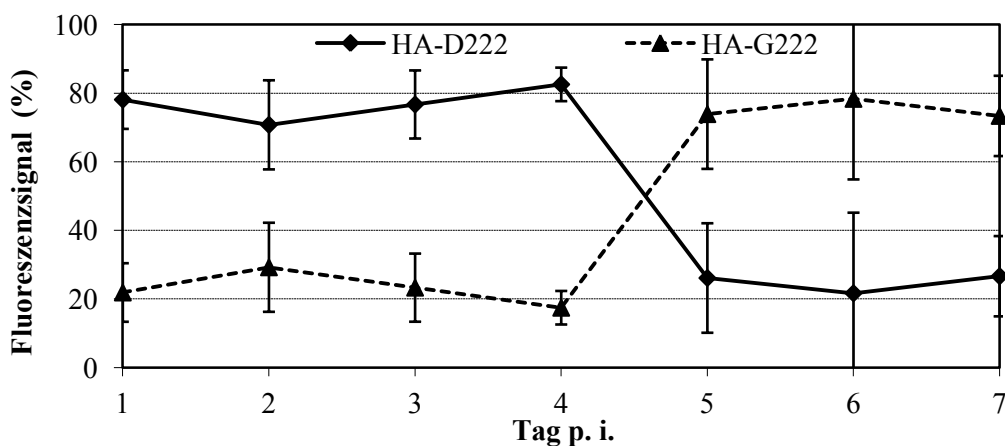


Abbildung 13: Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante während der Infektion in der Lunge. **(A)** Anhand des Fluoreszenzsignals des Sequenzchromatogramms wurde der prozentuale Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante in den Lungenproben von Mäusen, die an den Tagen 1 bis 7 p. i. sezirt wurden, ermittelt. Das Signal für beide Varianten wurde für jede untersuchte Maus einzeln berechnet. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von allen Mäusen, die am selben Tag sezirt wurden, bestimmt. **(B)** Für jeden Untersuchungstag ist ein repräsentatives Chromatogramm einer Lungenprobe dargestellt. Das Triplet GAT kodiert für die AS Asparaginsäure (D) und GGT für Glycin (G).

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, ob sich die Anteile der HA-D222- und der HA-G222-Variante von mpJena/5258 im Infektionsverlauf in der Lunge und der Trachea veränderten. Dazu wurde RNA aus Organhomogenaten von allen infizierten Mäusen, die an den Tagen 1 bis 7 p. i. sezirt wurden, isoliert und ein HA-222-kodierender Abschnitt des HA-Gensegments sequenziert. Mit Ausnahme jeweils einer Tracheaprobe von Tag 5, 6 und 7 p. i., in denen der Anteil der viralen RNA zu gering für eine Amplifikation des zur Sequenzierung benötigten PCR-Fragments war, wurden die Sequenzen aller Proben ermittelt und der prozentuale Anteil beider Varianten anhand des Fluoreszenzsignals im

Chromatogramm berechnet. In der Lunge konnte ein Anstieg des Guaninsignals, welches die HA-G222-Variante repräsentierte, von 8 % am Tag 1 p. i. auf maximal 27 % am Tag 5 p. i. beobachtet werden, gefolgt von einem Rückgang auf 17 % bis zum Tag 7 p. i. (Abbildung 13). Die HA-D222-Variante blieb mit einem Anteil von 73 bis 92 % über den gesamten Untersuchungszeitraum die dominante Variante. In der Trachea stellte die HA-G222-Variante von Tag 1 bis 4 p. i. die kleinere Population dar (Abbildung 14). Doch ab Tag 5 p. i. änderte sich das Verhältnis der beiden Populationen zueinander und die HA-G222-Variante überwog mit einem Anteil von 73 bis 78 %.

A



B

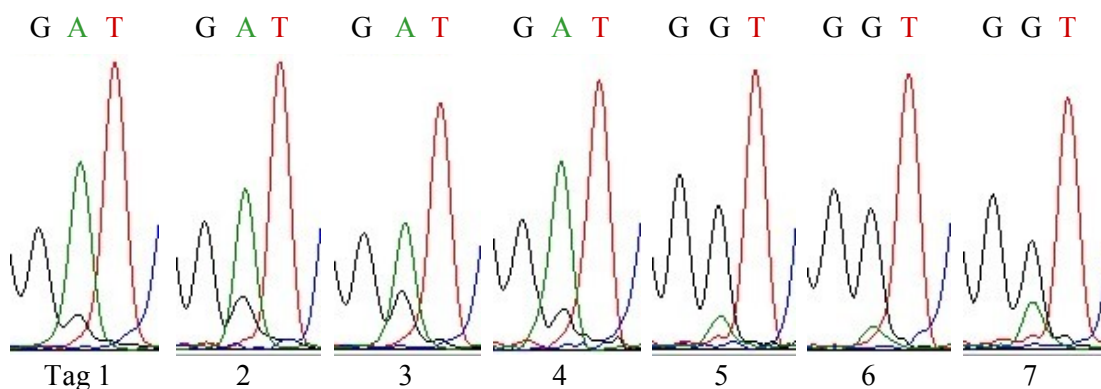


Abbildung 14: Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante während der Infektion in der Trachea. **(A)** Anhand des Fluoreszenzsignals des Sequenzchromatogramms wurde der prozentuale Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante in den Tracheaprobe von Mäusen, die an den Tagen 1 bis 7 p. i. seziiert wurden, ermittelt. Das Signal für beide Varianten wurde für jede untersuchte Maus einzeln berechnet. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von allen Mäusen, die am selben Tag seziiert wurden, bestimmt. **(B)** Für jeden Untersuchungstag ist ein repräsentatives Chromatogramm einer Tracheaprobe dargestellt. Das Triplet GAT kodiert für die AS Asparaginsäure (D) und GGT für Glycin (G).

Diese Resultate warfen die Frage auf, ob bereits in den Mäusen, die mit dem Ausgangsvirus Jena/5258 infiziert wurden, die HA-222-Quasispezies vorhanden waren. Um dies beantworten zu können, wurden die HA-Sequenzen in Lungen- und Tracheaprobe von drei Jena/5258-infizierten Mäusen, die am Tag 4 p. i. seziert wurden, untersucht. Unter diesen Tieren befand sich auch die Maus, deren Lungenhomogenat zur Herstellung von mpJena/5258 genutzt wurde (Maus # 46). In den Lungen aller drei Mäuse wurde nur die HA-D222-Variante nachgewiesen (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu enthielten zwei der drei Tracheaprobe, u.a. die der Maus # 46, überwiegend oder ausschließlich die HA-G222-Variante (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante in Lungen- und Tracheaprobe Jena/5258-infizierter Mäuse

Organprobe von	Fluoreszenzsignal (%)			
	in der Lunge		in der Trachea	
	HA-D222	HA-G222	HA-D222	HA-G222
Jena/5258-infizierte Maus # 46 ^a	100	n. d.	n. d.	100
Jena/5258-infizierte Maus # 47	100	n. d.	100	n. d.
Jena/5258-infizierte Maus # 48	100	n. d.	9,9	90,1

^a Das Lungenhomogenat dieser Maus wurde zur Herstellung des Isolats mpJena/5258 einmalig auf MDCK-Zellen vermehrt.

n. d. nicht detektiert

Um sicher zu stellen, dass während der einmaligen Passagierung von Jena/5258 in der Maus, die zur Herstellung von mpJena/5258 führte, keine Substitutionen auftraten, wurden neben den bereits zuvor untersuchten Segmenten HA und NA (Abbildung 7 und 8) (Seidel 2011) auch die Segmente PB2, PB1, PA, NP, M, NS von Jena/5258 und mpJena/5258 sequenziert (GenBank-Nummer KJ549775, KJ549776, KJ549777, KJ549779, KJ549781 KJ549782). Die Sequenzanalyse ergab lediglich einen Nukleotidaustausch im PB2-Segment an der ersten Position des für die AS 713 kodierenden Triplets (Nukleotid 2137) von Cytosin (Jena/5258) zu Thymin (mpJena/5258). Diese Veränderung hatte keinen Einfluss auf die AS-Sequenz, sodass beide Isolate für identische Proteine kodieren.

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der biphasische Titerverlauf in mpJena/5258-infizierten Mäusen auf einem HA-222D/G-Polymorphismus beruhte. Die Tatsache, dass in mpPotsdam/15-infizierten Tieren keine HA-Sequenzveränderungen festgestellt werden konnten, unterstützte diese Annahme indirekt. Die Anteile der HA-222-Quasispezies von mpJena/5258 veränderten sich im Untersuchungszeitraum in der Trachea

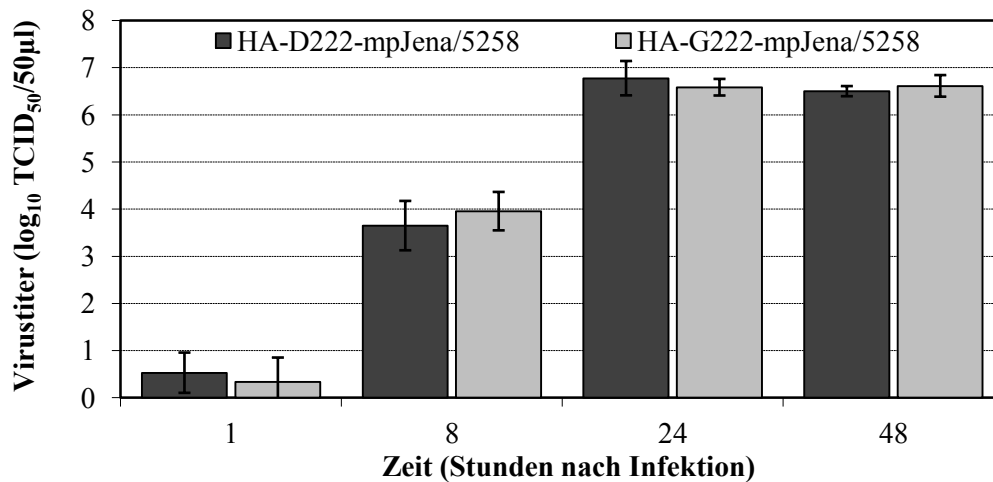
und der Lunge. Dies ließ eine unterschiedliche Replikation der Subpopulationen in beiden Organen vermuten. Mithilfe weiterer Experimente sollte diese Annahme überprüft werden.

Da sich die Rezeptorexpression in der Trachea und der Lunge von BALB/c-Mäusen unterscheidet (Ning et al. 2009) und die HA-222, an der der Polymorphismus auftrat maßgeblich die Rezeptorspezifität beeinflusst (Stevens et al. 2006), sollte der Einfluss von einem HA-D222 und einem HA-G222 auf die Rezeptorbindung untersucht werden. Dazu wurden die HA-D222-Variante aus dem Virus mpJena/5258 und die HA-G222-Variante aus einem Tracheaisolat einer mpJena/5258-infizierten Maus, die am Tag 5 p. i. seziert wurde, über eine dreimalige Plaquareinigung isoliert. Anschließend wurde das HA der erhaltenen Virusisolate HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 sequenziert. Das HA von HA-D222-mpJena/5258 wies eine vollständige Übereinstimmung mit mpJena/5258 auf. An der HA-222 wurde kein Polymorphismus beobachtet. Das HA von HA-G222-mpJena/5258 beinhaltete HA-G222 ohne eine erkennbare Doppelsequenz sowie die Substitution HA-S84I, die jedoch nicht innerhalb der Rezeptorbindestelle liegt.

Um die Bedeutung des HA-222D/G-Polymorphismus für die Rezeptorbindung zu klären, wurde die Replikation der Plaque-gereinigten Viren auf MDCK- und MDBK-Zellen überprüft (vgl. 4.1.1). Beide Viren replizierten in MDCK-Zellen, die sowohl SA α 2,3Gal als auch SA α 2,6Gal exprimierten, zu ähnlich hohen Titern (Abbildung 15A). In MDBK-Zellen, welche hauptsächlich SA α 2,3Gal auf ihrer Oberfläche trugen, wurde für HA-G222-mpJena/5258 48 Stunden nach der Infektion ein signifikant höherer Titer festgestellt als für HA-D222-mpJena/5258 (Abbildung 15B). Jedoch lagen die maximalen Titer für beide Viren in MDBK-Zellen deutlich unter denen, die in MDCK-Zellen erreicht wurden. Diese Ergebnisse zeigten, dass beide Viren SA α 2,6Gal für eine effiziente Replikation benötigen und HA-G222-mpJena/5258 besser an SA α 2,3Gal bindet als HA-D222-mpJena/5258.

Weiterhin wurde ein Hämagglutinationstest mit Hühner- und Schaferythrozyten durchgeführt (vgl. 4.1.2), um den Einfluss des HA-222D/G-Polymorphismus von mpJena/5258 auf die Rezeptorspezifität genauer zu untersuchen. Die Analyse der Plaque-gereinigten Viren ergab, dass beide Varianten die Hühnererythrozyten bei 4 °C hämagglutinierten, jedoch nur HA-D222-mpJena/5258 bei 37 °C die Hämagglutination aufhob (Tabelle 12). Die Schaferythrozyten wurden lediglich durch HA-G222-mpJena/5258 bei 4 °C hämagglutiniert, welches bei 37 °C wieder vollständig von den Erythrozyten eluieren konnte.

A



B

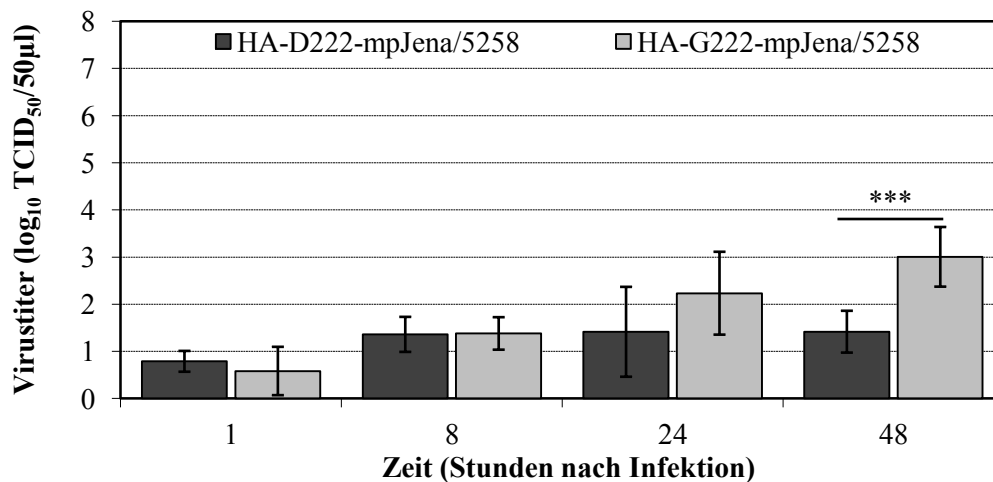


Abbildung 15: Replikation von HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 in (A) MDCK- und (B) MDBK-Zellen. Dargestellt sind der mittlere Virustiter und die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Versuchen mit je drei Parallelen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. *** $p < 0,001$

Um den Unterschied zwischen den beiden Virusvarianten zu bestätigen, wurden je drei Tracheaisolate von Mäusen, die am Tag 1 und 5 p. i. seziiert wurden, einmalig auf MDCK-Zellen vermehrt und anschließend ebenfalls getestet. Die Isolate vom Tag 1 p. i., in denen die HA-D222-Variante dominierte (Abbildung 14), wiesen ebenfalls eine Bindung an Hühnererythrozyten bei 4 °C und eine vollständige Elution bei 37 °C sowie keine Bindung an Schaferythrozyten auf (Tabelle 12). Im Gegensatz dazu war für die Isolate vom Tag 5 p. i., die überwiegend die HA-G222-Variante enthielten (Abbildung 14), nur eine mäßige Elution von den Hühnererythrozyten bei 37 °C zu beobachten, die durch den geringen Anteil der HA-D222-Variante in den Proben verursacht wurde. Jedoch hämagglutinierten diese Viren wie

HA-G222-mpJena/5258 die Schaferythrozyten bei 4 °C und zeigten bei 37 °C eine deutliche Elution. Diese Ergebnisse belegen die Bindung beider Varianten an SA α 2,6Gal sowie eine stärkere Bindung der HA-G222-Variante an SA α 2,3Gal. Somit hatte der HA-222D/G-Polymorphismus einen deutlichen Einfluss auf die Rezeptorspezifität.

Tabelle 12: Bindung und Elution von Hühner- und Schaferythrozyten durch die HA-D222- und HA-G222-Variante

Virusisolat	Hämagglutinationstiter			
	Hühnererythrozyten		Schaferythrozyten	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
HA-D222-mpJena/5258	160	< 10	< 10	< 10
HA-G222-mpJena/5258	80	80	40	< 10
mpJena/5258 Trachea Tag 1 p. i. ^a (222D>>G) ^b	320	< 10	< 10	< 10
	160	< 10	< 10	< 10
	160	< 10	< 10	< 10
mpJena/5258 Trachea Tag 5 p. i. ^a (222D<<G) ^c	160	80	40	< 10
	160	40	40	< 10
	80	40	20	< 10

^a Die Viren wurden aus Tracheahomogenaten von mpJena/5258-infizierten Mäusen, die am Tag 1 oder 5 p. i. seziiert wurden, durch einmalige Vermehrung auf MDCK-Zellen gewonnen.

^b Am Tag 1 p. i. war die HA-D222-Variante in der Trachea dominant.

^c Am Tag 5 p. i. war die HA-G222-Variante in der Trachea dominant.

Weiterhin konnte durch die Hämagglutinationstests eine Veränderung in der NA-HA-Balance festgestellt werden. Die Elution von HA-D222-mpJena/5258 von den Hühnererythrozyten und von HA-G222-mpJena/5258 von den Schaferythrozyten verdeutlichte die gute funktionelle Balance der Viren im jeweiligen Testsystem.

Weil die HA-222 auch ein Teil der Antigenerkennungsstelle Ca2 ist (Abbildung 7), sollte die Bedeutung des HA-222D/G-Polymorphismus für die Antikörperbildung und -erkennung in mpJena/5258-infizierten Mäusen analysiert werden. Dazu wurde mit den Seren der seziierten Tiere und den beiden Plaque-gereinigten Virusvarianten ein Neutralisationstest durchgeführt. Die ersten neutralisierenden Antikörper gegen beide Viren waren am Tag 6 p. i. nachweisbar, jedoch war der Titer gegen HA-D222-mpJena/5258 signifikant höher als der gegen HA-G222-mpJena/5258 (Abbildung 16). In den folgenden Tagen stiegen die Titer weiter an, wobei die Titer gegen HA-D222-mpJena/5258 stets höher blieben als die gegen HA-G222-

mpJena/5258. Diese Ergebnisse konnten einerseits in einer schwächeren Induktion der Antikörperantwort aufgrund des niedrigen Anteils der HA-G222-Variante in den ersten Tagen nach der Infektion oder andererseits in einer schlechteren Erkennung der HA-G222-Variante durch die Antikörper begründet sein.

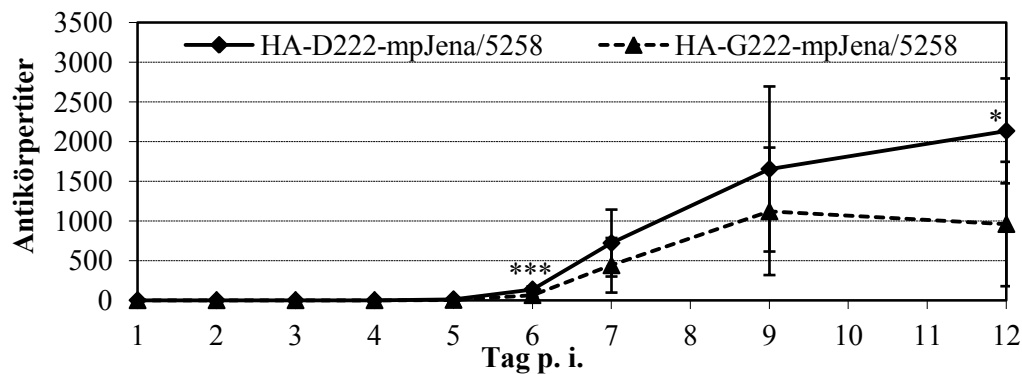


Abbildung 16: Antikörpertiter in den Seren mpJena/5258-infizierter Mäuse gegen HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258. Dargestellt sind die mittleren Antikörpertiter und die Standardabweichungen der Seren aller Mäuse, die am jeweiligen Tag seziert wurden. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Um diese Fragestellung zu klären, wurden Mausseren vom Tag 21 p. i. aus einem antiviralen Versuch mit dem Plaque-gereinigten Virus HA-G222-mpJena/5258 auf neutralisierende Antikörper untersucht ($n = 7$; vgl. 4.4.2). Die Seren stammten von Placebo- ($n = 3$), Oseltamivir- ($n = 2$) und Ribavirin-behandelten ($n = 2$) Mäusen. Zwischen den Tieren aus verschiedenen Behandlungsgruppen war kein Unterschied in der Höhe der Antikörpertiter feststellbar. Der Test ergab einen Antikörpertiter von 2011 ± 684 für HA-D222-mpJena/5258 und einen signifikant niedrigeren Titer von 1188 ± 242 für HA-G222-mpJena/5258 ($p = 0,018$). Da der Titer gegen HA-G222-mpJena/5258, welches zur Infektion genutzt wurde, signifikant niedriger war als der gegen HA-D222-mpJena/5258, konnte gezeigt werden, dass die HA-G222-Variante generell schlechter von neutralisierenden Antikörpern erkannt wurde. Weiterhin wurde der Antikörpertiter in den Seren mpPotsdam/15-infizierter Mäuse gegen das Infektionsvirus bestimmt. Die ersten Antikörper waren am Tag 7 p. i. nachweisbar (Abbildung 17). Bis zum Tag 11 p. i. stieg der Antikörpertiter auf 120 ± 135 weiter an. Damit lagen die Titer deutlich unter denen, die für mpJena/5258-infizierte Mäuse beobachtet wurden. Da mpPotsdam/15 eine HA-G222-Variante darstellt, stellte sich auch hier die Frage, ob das Virus eine schwache Antikörperbildung induzierte oder schlecht durch die Antikörper erkannt wurde. Aus diesem Grund wurde die Kreuzreaktivität in den Seren der

mpPotsdam/15-infizierten Mäuse von Tag 11 p. i. ($n = 4$) gegen HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 getestet. Mit Titern von 920 ± 1111 für HA-D222-mpJena/5258 und 320 ± 226 für HA-G222-mpJena/5258 lagen die Titer deutlich über denen von mpPotsdam/15. Aufgrund der hohen Standardabweichungen war der Unterschied nicht signifikant. Die niedrigen Antikörpertiter gegen mpPotsdam/15 und HA-G222-mpJena/5258 unterstreichen dennoch die schlechte Erkennung von Viren mit einem HA-G222 durch neutralisierende Antikörper.

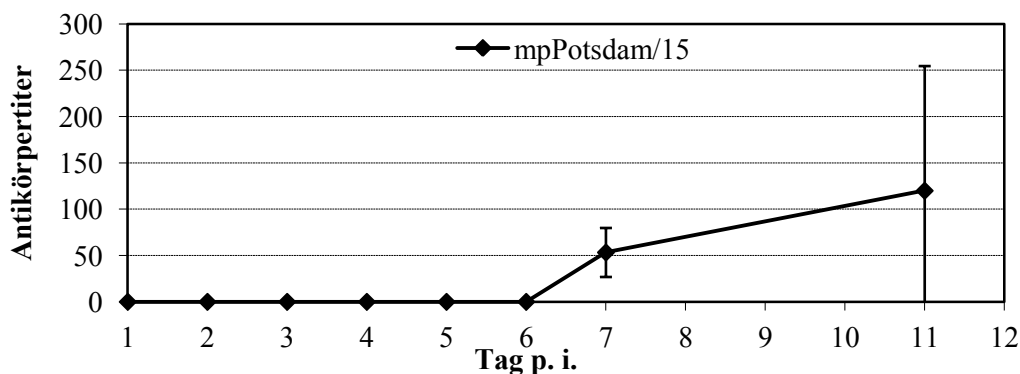


Abbildung 17: Antikörpertiter in den Seren mpPotsdam/15-infizierter Mäuse gegen mpPotsdam/15. Dargestellt sind die mittleren Antikörpertiter und die Standardabweichungen der Seren aller Mäuse, die am jeweiligen Tag seziiert wurden.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigten, dass die in zwei Phasen verlaufende Erkrankung mpJena/5258-infizierter Mäuse mit einer biphasischen Virusreplikation in der Lunge und der Trachea korrelierte, wobei die späte, zweite Erkrankungsphase schwerer ausfiel als die erste. Mittels Sequenzierung des HA-Gensegments aus Lungen- und Tracheaprobe wurde ein Organ-spezifischer HA-222D/G-Polymorphismus nachgewiesen. Die HA-D222-Variante dominierte im gesamten Untersuchungszeitraum in der Lunge. In der Trachea setzte sich am Tag 5 p. i. die HA-G222-Variante durch.

Im Unterschied dazu führte die Infektion von Mäusen mit mpPotsdam/15 zwischen Tag 5 bis 7 p. i. zu maximalen Krankheitssymptomen. Es kam nicht zu einem AS-Austausch an der HA-222.

Weitere Untersuchungen belegten Unterschiede in der Rezeptorspezifität und der Antigenität der untersuchten Plaque-gereinigten Viren HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258. Die HA-D222-Variante band hauptsächlich an SA α 2,6Gal, während die HA-G222-Variante neben einer starken Bindung an SA α 2,6Gal auch vermehrt SA α 2,3Gal

erkannte. Zudem ließen sich mpPotsdam/15 und die HA-G222-Variante im Vergleich zur HA-D222 Variante schlechter mit Antikörpern neutralisieren.

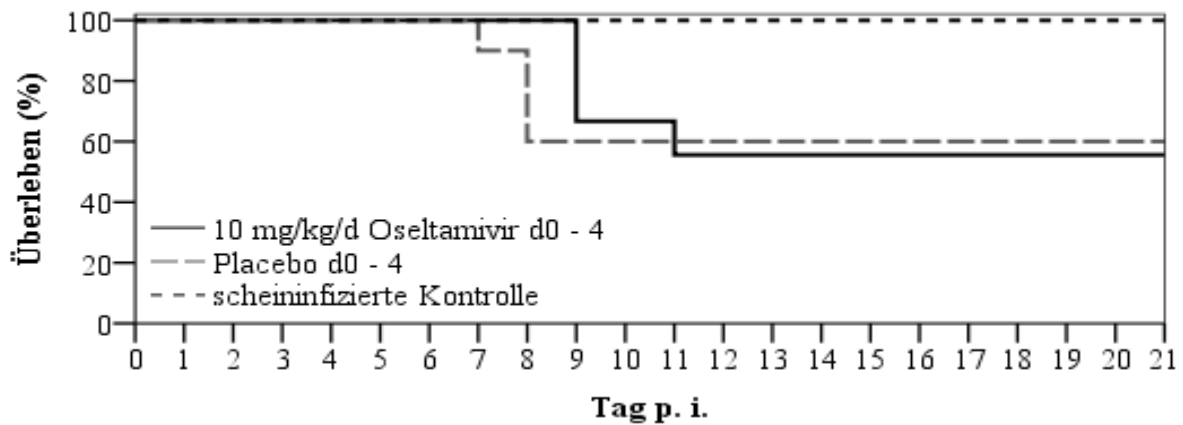
4.3 *In vivo*-Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin bei Infektion mit einem IAV mit HA-222D/G-Polymorphismus

Eine Behandlung mit 10 mg/kg/d Oseltamivir (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, über 5 Tage, zweimal täglich verabreicht) hatte bei Mäusen, die mit 10^6 TCID₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden, keinen therapeutischen Effekt (Seidel 2011). Ursächlich dafür könnte die biphasische Replikation bis zum Tag 7 p. i. sein (Abbildung 11C). In der vorliegenden Dissertation sollte nun geprüft werden, ob der Behandlungseffekt durch (a) eine niedrigere Infektionsdosis (10^5 statt 10^6 TCID₅₀), (b) eine höhere Oseltamivir-Konzentration (100 statt 10 mg/kg/d) bzw. (c) eine längere Behandlung (7 statt 5 Tage) gesteigert werden kann.

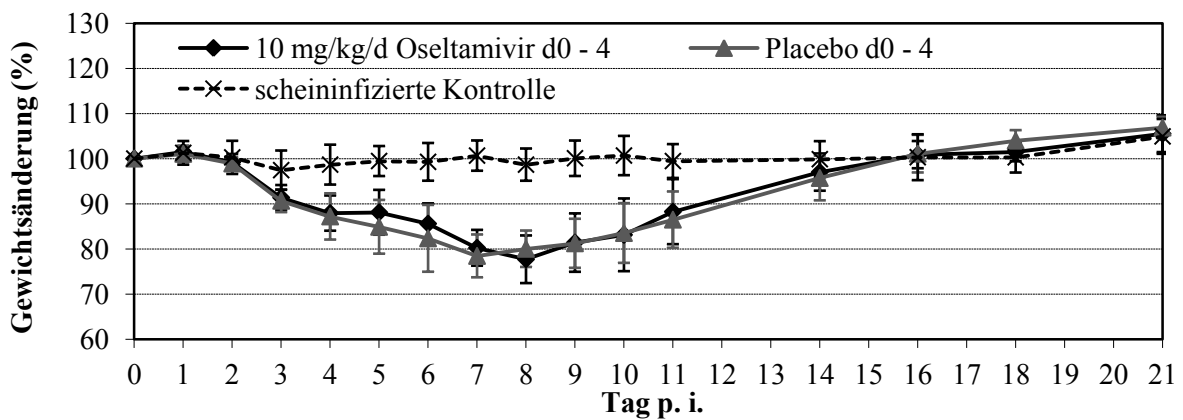
Zunächst wurde der antivirale Versuch mit 10 mg/kg/d Oseltamivir (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, über 5 Tage, zweimal täglich verabreicht) mit einer **10-fach niedrigeren Virusdosis von 10^5 TCID₅₀ pro Maus** wiederholt. Die nichtinfizierten Kontrollmäuse zeigten keine Krankheitszeichen (Abbildung 18, Tabelle 13), während die Placebo- sowie Oseltamivir-behandelten Mäuse erkrankten und ca. 40 % der Tiere wegen starkem Körpergewichtsverlust bis zum Tag 11 p. i. abgetötet werden mussten (Abbildung 18A und B). Die Oseltamivir-Gabe zeigte keinen Effekt auf die Schwere der Erkrankung (Abbildung 18B und C). Das Maximum der Symptome verschob sich durch die Substanzbehandlung lediglich von Tag 7 auf Tag 8 p. i. Im Anschluss erholten sich die überlebenden Mäuse vollständig. Der zuvor für mpJena/5258 nach Infektion mit 10^6 TCID₅₀ pro Maus beschriebene biphasische Symptomverlauf (vgl. 4.2.1) war bei Anwendung der niedrigeren Infektionsdosis nur teilweise in den Einzelkurven der überlebenden Mäuse, nicht aber in den Kurven der verstorbenen Tiere, zu erkennen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Untersuchung der Lungen- und Tracheatiter nach der Sektion am Tag 4 p. i. ergab keine Unterschiede zwischen Oseltamivir-behandelten und Placebo-Tieren (Tabelle 13). Auch bezüglich des Lungengewichts und des histopathologischen Scores ließ sich kein Effekt durch die Oseltamivir-Behandlung nachweisen. Durch eine Verringerung der Infektionsdosis von 10^6 auf 10^5 TCID₅₀ wurde somit keine Verbesserung der Oseltamivir-Wirkung erzielt.

A



B



C

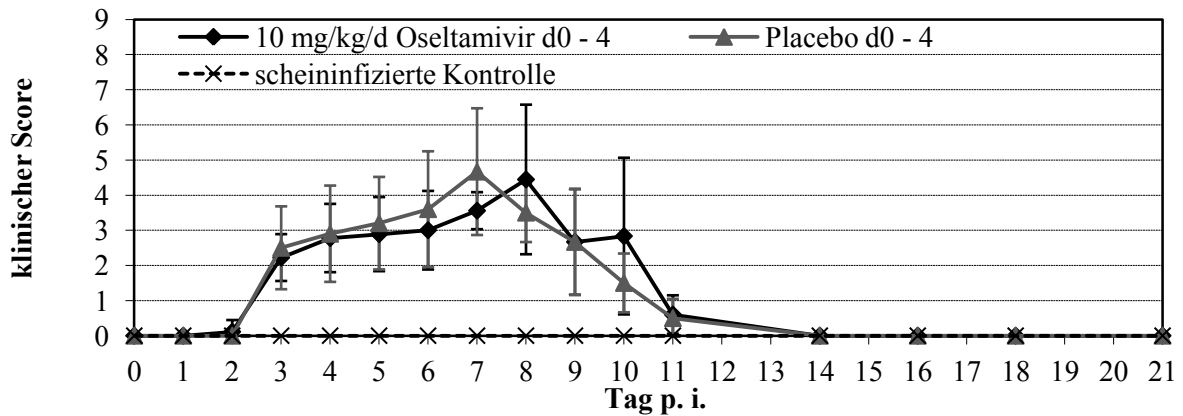
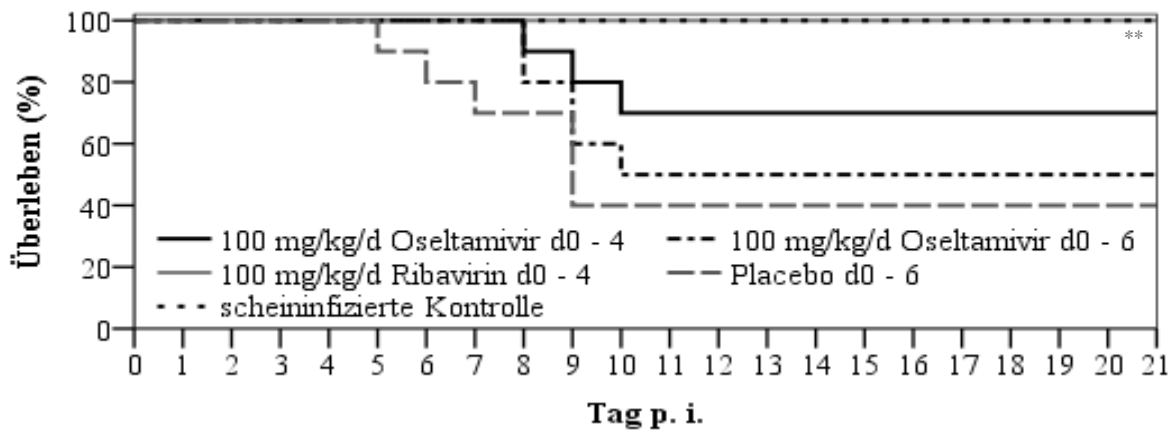


Abbildung 18: Einfluss der Oseltamivir-Behandlung (10 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf (A) das Überleben, (B) die Gewichtsänderung und (C) den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^5 TCID₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden. Die Gewichtsänderung und der klinische Score sind jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aller noch lebenden Mäuse einer Gruppe für den entsprechenden Tag dargestellt.

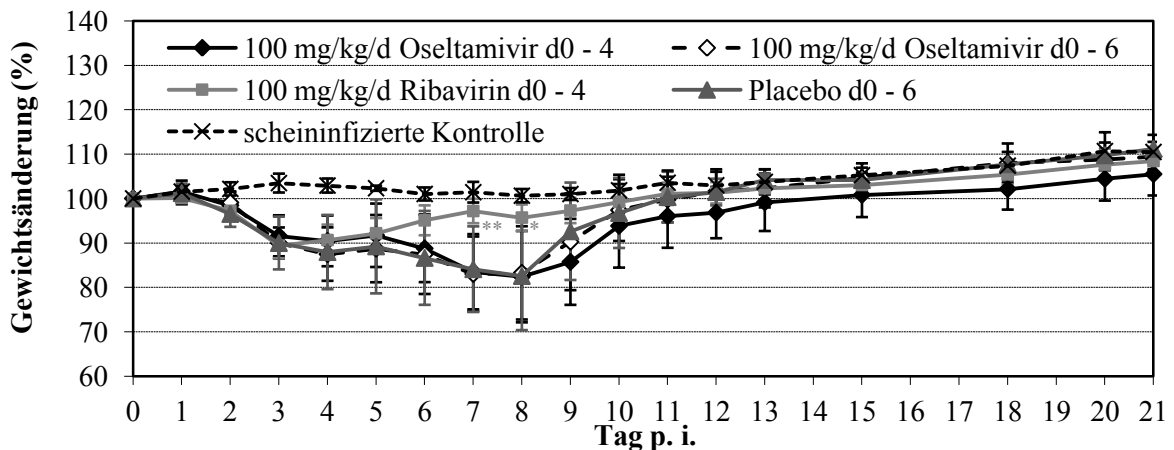
In einem weiteren Experiment wurde die Wirksamkeit einer **Oseltamivir-Konzentration von 100 mg/kg/d** (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, zweimal täglich verabreicht)

bei einer Infektion mit 10^6 TCID₅₀ mpJena/5258 untersucht. Eine Versuchsgruppe erhielt die **Substanz über 5 Tage** (Tag 0 bis 4 p. i.) und eine weitere Gruppe **über 7 Tage** (Tag 0 bis 6 p. i.). Zusätzlich wurde der Wirkeffekt von 100 mg/kg/d Ribavirin über 5 Tage (Tag 0 bis 4 p. i.) vergleichend analysiert. 40 % der Placebo-Mäuse überlebten in diesem Experiment die mpJena/5258-Infektion (Abbildung 19A). Weder die Behandlung der infizierten Mäuse mit 100 mg/kg/d Oseltamivir über 5 Tage noch über 7 Tage führte zu einer signifikanten Verbesserung der Studienparameter (Abbildung 19 und Tabelle 13). mpJena/5258 verursachte in der Placebo-Gruppe und den beiden Oseltamivir-Gruppen den bereits zuvor beschriebenen biphasischen Krankheitsverlauf (siehe 4.2.1, Abbildung 19B und C).

A



B



C

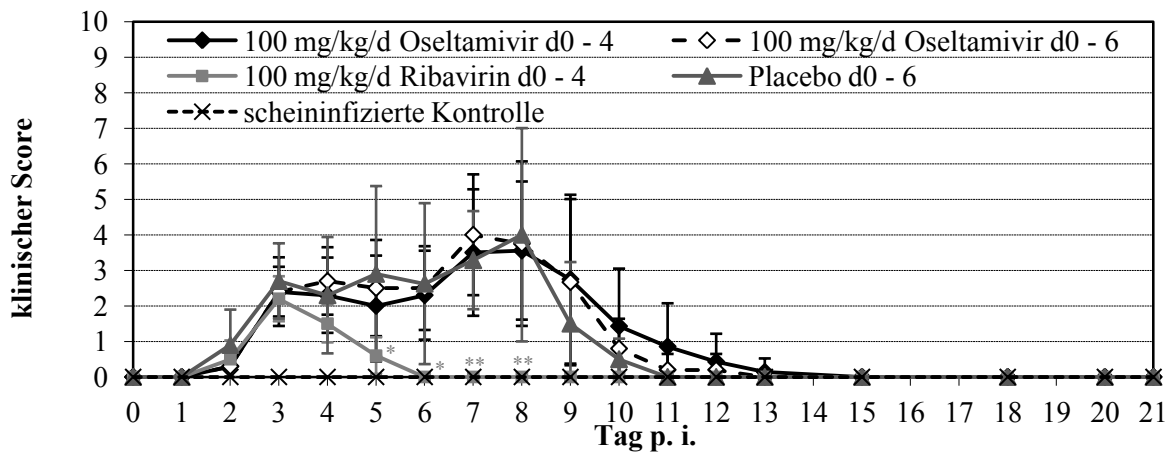


Abbildung 19: Einfluss der Dauer der Oseltamivir-Behandlung (100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 [d0 - 4] bzw. 7 Tage [d0 - 6], beginnend 4 h vor Infektion.) sowie einer Ribavirin-Behandlung (100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf (A) das Überleben, (B) die Gewichtsänderung und (C) den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^6 TCID₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden. Die Gewichtsänderung und der klinische Score sind jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aller noch lebenden Mäuse einer Gruppe für den entsprechenden Tag dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Substanz- und Placebo-behandelten, infizierten Mäusen sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Im Gegensatz zur Oseltamivir-Behandlung verhinderte die Ribavirin-Gabe einen letalen Krankheitsverlauf ($p = 0,004$, Abbildung 19A). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der mittleren Überlebenszeit wider (Tabelle 13), wo lediglich die Ribavirin-Behandlung in einem signifikanten Unterschied zu den Placebo-Tieren resultierte ($p = 0,013$). Die Ribavirin-Gabe verkürzte zudem signifikant die Dauer der Erkrankung (Abbildung 19B und C). Am Tag 3 p. i. wurde eine maximale Gewichtsabnahme von 10,4 % und ein klinischer Score von 2,2 festgestellt, gefolgt von einer schnellen Erholung der Mäuse. Die zweite Krankheitsphase konnte vollständig verhindert werden. Infolge der Ribavirin-Behandlung kam es weiterhin zu einer signifikanten Senkung des Lungentiters am Tag 4 p. i. um mehr als eine Log-Stufe (Tabelle 13; $p = 0,005$). Ribavirin hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Lungengewicht, den Tracheatiter und die histopathologischen Scores am Tag 4 p. i.

Die Tracheatiter der infizierten Mäuse wiesen für alle untersuchten Gruppen in diesem und dem vorangegangenen antiviralen Versuch mit mpJena/5258 eine hohe Standardabweichung auf (Tabelle 13), da in jeder Versuchsgruppe für mindestens eine Maus kein Virus detektiert werden konnte (Detektionslimit $2,67 \log_{10}$ TCID₅₀/g).

Tabelle 13: Einfluss der antiviralen Behandlung auf die mittlere Überlebenszeit sowie das Lungengewicht, den Lungen- und Tracheatiter und den histopathologischen Score am Tag 4 p. i. von BALB/c-Mäusen, die mit verschiedenen Virusdosen von mpJena/5258 infiziert oder scheininfiziert wurden.

Infektions- dosis (TCID ₅₀)	Behandlung	mittlere Über- lebenszeit	Sektion Tag 4 p. i. ^a			
			Lungenge- wicht (%) ^b	Lungen- titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g)	Trachea- titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g)	histopatho- logischer Score
10 ⁵	10 Osel d0 - 4	15,89 ± 6,09	1,31 ± 0,29	6,27 ± 0,49	2,41 ± 2,29	1,00 ± 0,00
	Placebo d0 - 4	15,70 ± 6,85	1,51 ± 0,20	6,17 ± 0,50	2,83 ± 1,59	1,40 ± 0,55
	scheininf. Placebo d0 - 4	21,00 ± 0,00	0,87 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10 ⁶	100 Osel d0 - 4	17,40 ± 5,82	1,31 ± 0,23 ^c	5,96 ± 0,36 ^c	2,72 ± 2,11 ^c	1,00 ± 0,43 ^c
	100 Osel d0 - 6	14,90 ± 6,45				
	100 Riba d0 - 4	> 21,00 *	1,07 ± 0,21	5,13 ± 0,77 **	1,84 ± 2,12	1,10 ± 0,55
	Placebo d0 - 6	12,90 ± 7,09	1,41 ± 0,15	6,50 ± 0,69	3,09 ± 1,76	1,50 ± 0,71
	scheininf. Placebo d0 - 6	> 21,00	0,85 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

^a Da die Mäuse bereits am Tag 4 p. i. seziert wurden, war eine Behandlung darüber hinaus nicht möglich.

^b Das Lungengewicht ist als prozentualer Anteil vom Gesamtgewicht der Mäuse am Tag 4 p. i. angegeben.

^c Da sich die Behandlung der beiden Oseltamivir-Gruppen bis zum Tag 4 p. i. nicht unterschied, wurden die Werte dieser Gruppen zusammengefasst.

10 Osel = 10 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Osel = 100 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Riba = 100 mg/kg/d Ribavirin; d = Tag; scheininf. = scheininfiziert; Signifikanz im Vergleich zu den infizierten, Placebo-behandelten Mäusen: * p < 0,05; ** p < 0,01

Ein Vergleich der Untersuchungsparameter der Placebo-Mäuse, die in den antiviralen Versuchen mit 10⁵ oder 10⁶ TCID₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden, ergab nur geringfügige Unterschiede (Abbildung 18, 19 und Tabelle 13).

Die histologischen Lungenschnitte der scheininfizierten Kontrolliere vom Tag 4 p. i. zeigten eine feingliedrige Struktur der Alveolen sowie dünnwandige Bronchiolen und Blutgefäße (Abbildung 20). Hingegen waren in den Lungen infizierter Mäuse hauptsächlich Infiltrate und teilweise auch ödematöse und hämorrhagische Veränderungen festzustellen. In beiden Placebo-Gruppen (10⁵ und 10⁶ TCID₅₀) bildeten sich um die Bronchien und Bronchiolen größere Immunezellinfiltrate, deren Dichte mit zunehmender Ausbreitung in das alveoläre

Gewebe abnahm. Ein Unterschied zwischen Placebo-Tieren, die mit 10^5 und 10^6 TCID₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden, ließ sich in der Größe und Ausprägung der histopathologischen Veränderungen nicht erkennen. Alle Substanzbehandlungen reduzierten die Ausbreitung der Veränderungen im alveolären Gewebe geringfügig, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.

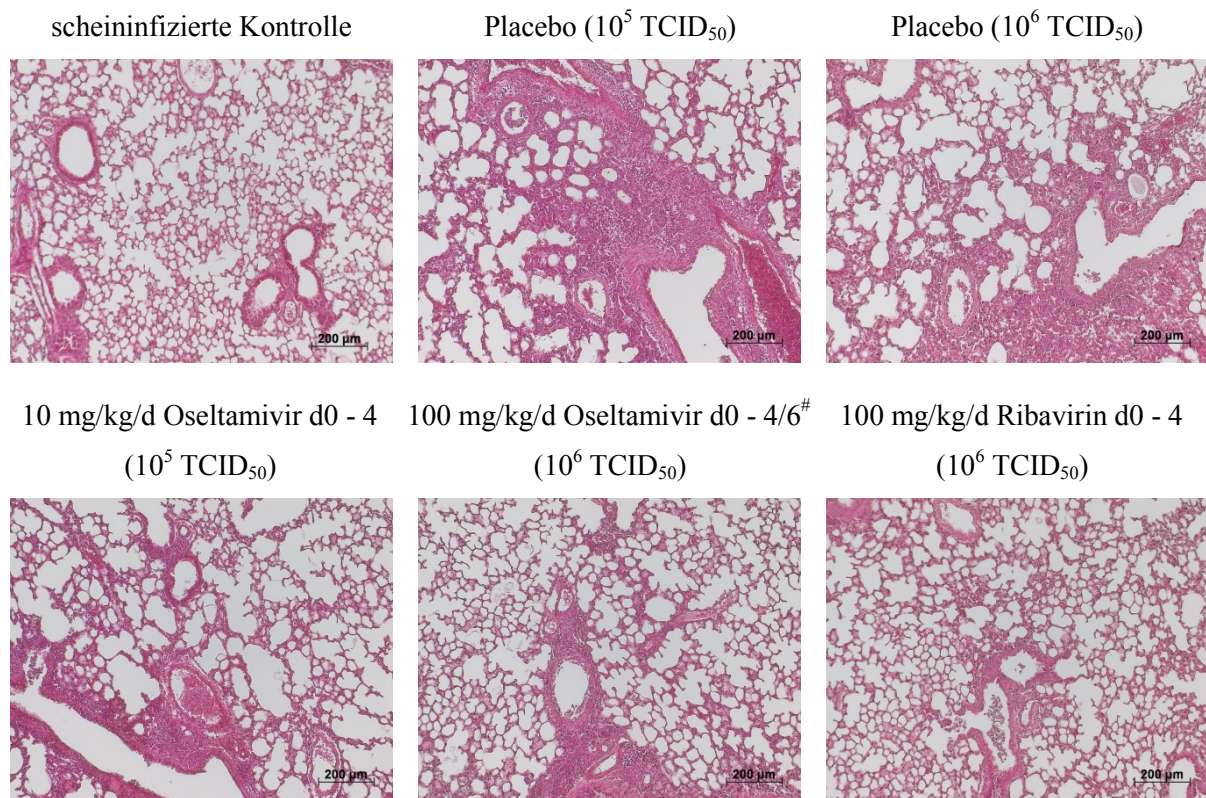


Abbildung 20: Einfluss der Oseltamivir- und Ribavirin-Behandlung auf die Lungenhistopathologie mpJena/5258-infizierter Mäuse am Tag 4 p. i. Die Mäuse wurden scheininfiziert oder mit einer Virusdosis von 10^5 oder 10^6 TCID₅₀ infiziert und mit dem Placebo, verschiedenen Oseltamivir-Konzentrationen oder Ribavirin behandelt. Die Behandlung erfolgte über den jeweils angegebenen Zeitraum bis maximal zum Tag 4 p. i., da an diesem Tag die Sektion erfolgte. Die Angabe des kompletten Behandlungszeitraums dient der Zuordnung in die unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Lungenschnitte wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt. [#] Weil sich die Behandlung der Mäuse bis zum Tag 4 p. i. nicht unterschied, wurden diese Gruppen zusammengefasst.

Zusammenfassung

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass weder eine Reduzierung der Infektionsdosis von 10^6 auf 10^5 TCID₅₀ pro Maus noch eine Erhöhung der Oseltamivir-Konzentration von 10 auf 100 mg/kg/d noch eine Verlängerung der Behandlung von 5 auf 7 Tage die therapeutische Wirkung von Oseltamivir nach der Infektion von BALB/c-Mäusen mit dem A(H1N1)pdm09-

Virus mpJena/5258 signifikant verbesserte (Tabelle 14). Im Gegensatz dazu erzielte die Verabreichung des Nukleosidanalogons Ribavirin eine signifikante Wirkung auf die Überlebensrate, das Körpergewicht, den klinischen Score, die mittlere Überlebenszeit und den Lungentiter am Tag 4 p. i. (Tabelle 14). Aufgrund dieser guten antiviralen Wirkung wurden Ribavirin-behandelte Mäuse als Kontrollgruppe in alle weiteren Tierversuche integriert.

Tabelle 14: Zusammenfassung der antiviralen Wirkung von Oseltamivir und Ribavirin in mpJena/5258 infizierten BALB/c-Mäusen (10^5 und 10^6 TCID₅₀).

Parameter	10 ⁵ TCID ₅₀ /Maus		10 ⁶ TCID ₅₀ /Maus	
	10 Osel	100 Osel	100 Osel	100 Riba
	d0 - 4	d0 - 4	d0 - 6	d0 - 4
Überleben	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss	signifikant
Körpergewichtsänderung	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss	signifikant
mittlere Überlebenszeit	kein Einfluss	nicht signifikant	kein Einfluss	signifikant
klinischer Score	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss	signifikant
Lungengewicht d4 p. i.	kein Einfluss	kein Einfluss ^a		nicht signifikant
Lungentiter d4 p. i.	kein Einfluss	nicht signifikant ^a		signifikant
Tracheatiter d4 p. i.	kein Einfluss	kein Einfluss ^a		kein Einfluss
histopathologischer Score d4 p. i.	kein Einfluss	kein Einfluss ^a		kein Einfluss

^a Da sich die Behandlung der beiden Oseltamivir-Gruppen bis zum Tag 4 p. i. nicht unterschied, wurden die Werte dieser Gruppen zusammengefasst.

10 Osel = 10 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Osel = 100 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Riba = 100 mg/kg/d Ribavirin; d = Tag

signifikant $p < 0,05$; nicht signifikant $0,1 > p > 0,05$, Tendenz zur Signifikanz erkennbar; kein Einfluss $p > 0,1$

4.4 *In vivo*-Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin bei Infektionen mit HA-G222-IAV-Varianten

Mithilfe weiterer *In vivo*-Versuche sollte getestet werden, ob sich HA-G222-Varianten (mpPotsdam/15 und HA-G222-mpJena/5258), die verstärkt an die in den murinen Atemwegen exprimierten Rezeptoren (SAα2,3Gal) binden, eine veränderte NA-HA-Balance im Mausmodell aufweisen und sich mit Oseltamivir behandeln lassen.

4.4.1 Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin in mpPotsdam/15-infizierten BALB/c-Mäusen

mpPotsdam/15-infizierte BALB/c-Mäuse (10^4 TCID₅₀) wurden zunächst mit **10 bzw. 100 mg/kg/d Oseltamivir oder 75 mg/kg/d Ribavirin** (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, über 5 Tage, zweimal täglich verabreicht) behandelt. Diese Ribavirin-Dosierung wurde in der Literatur mehrfach als untoxisch beschrieben und bei einer Influenzavirusinfektion angewendet (Ilyushina et al. 2008, Sidwell et al. 2005).

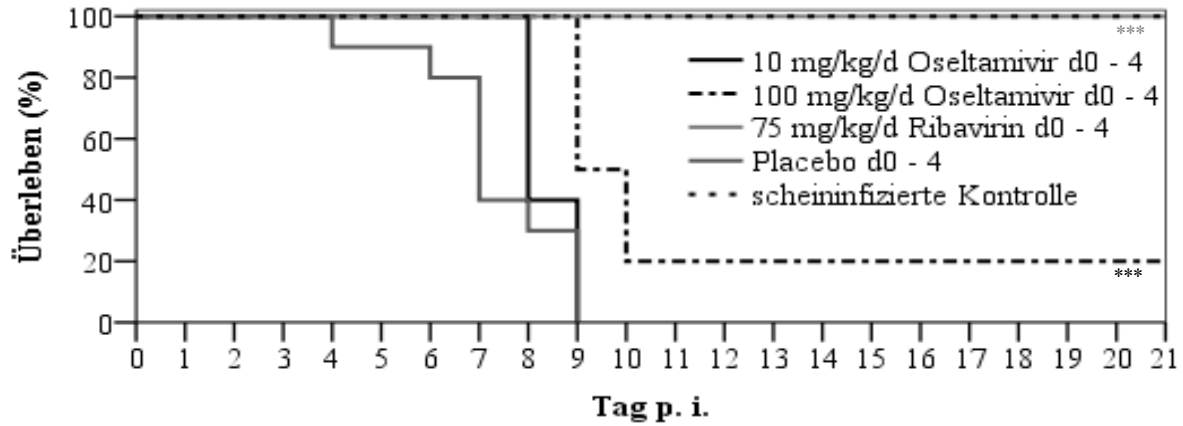
Alle Placebo-Mäuse und die mit 10 mg/kg/d Oseltamivir behandelten Mäuse mussten wegen einem Körpergewichtsverlust von über 25 % bis zum Tag 9 abgetötet werden (Abbildung 21A). Dabei war die mittlere Überlebenszeit der Placebo-Tiere etwa einen Tag kürzer als die der Oseltamivir-behandelten Mäuse (10 mg/kg/d; Tabelle 15). Die Verabreichung von 100 mg/kg/d Oseltamivir verlängerte signifikant die mittlere Überlebenszeit ($p < 0,001$) und reduzierte die Letalität ($p = 0,007$) im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Auch die Ribavirin-behandelten Mäuse, die die Infektion alle überlebten, zeigten signifikante Unterschiede für das Überleben ($p < 0,001$, Abbildung 21A) und die Überlebenszeit ($p < 0,001$; Tabelle 15).

Die mpPotsdam/15-Infektion führte in den Placebo-behandelten Mäusen zu einer schweren Erkrankung, die durch eine starke Gewichtsabnahme und einen schnellen Anstieg des klinischen Scores gekennzeichnet war (Abbildung 21 B und C). Die Gabe der niedrigen Oseltamivir-Konzentration (10 mg/kg/d) konnte den starken Gewichtsverlust nicht verhindern und wirkte sich auch nicht signifikant auf den klinischen Score aus. Die Behandlung mit 100 mg/kg/d Oseltamivir resultierte in einer signifikant niedrigeren Gewichtsabnahme am Tag 4 bis 6 p. i. und in einem signifikant niedrigerem klinischen Score am Tag 3 bis 6 p. i. Während und kurz nach der Substanzgabe zeigten die Mäuse nur geringe Krankheitssymptome. Diese stiegen jedoch nach Therapieende ab Tag 6 p. i. deutlich an und erreichten am Tag 8 bzw. 9 p. i. fast dieselbe Stärke wie in den Placebo-behandelten Mäusen. Die Ribavirin-behandelten Mäuse wiesen bis zum Tag 4 p. i. einen Krankheitsverlauf wie die Placebo-Mäuse auf (Abbildung 21 B und C). Ab dem darauffolgenden Tag verringerten sich ihre Symptome täglich, sodass vom Tag 6 bis 8 p. i. signifikante Unterschiede im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe ermittelt wurden.

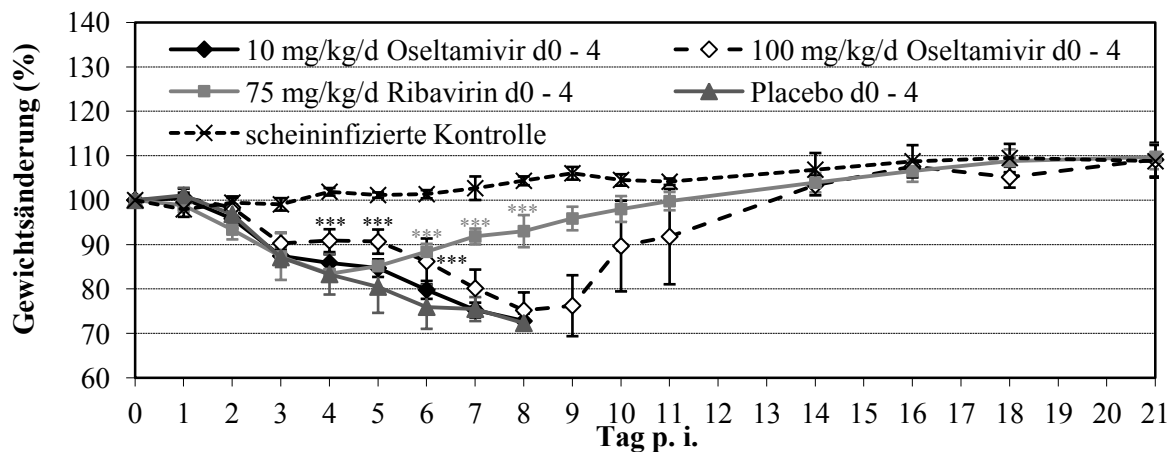
Das nach der Sektion am Tag 4 p. i. ermittelte Lungengewicht war in allen Substanz-behandelten Gruppen deutlich niedriger als in den Placebo-Mäusen (alle $p < 0,001$), jedoch immer noch höher als das der scheininfizierten Kontrollen (Tabelle 15). Der Virustiter in der Lunge konnte nur durch die Ribavirin-Behandlung um 1,5 Log-Stufen gesenkt werden ($p < 0,001$). Der histopathologische Score lag in allen Substanzgruppen unterhalb des Scores

der Placebo-Gruppe. Die Ribavirin-Behandlung hatte den größten Effekt und unterschied sich signifikant von den Placebo-Tieren ($p = 0,016$).

A



B



C

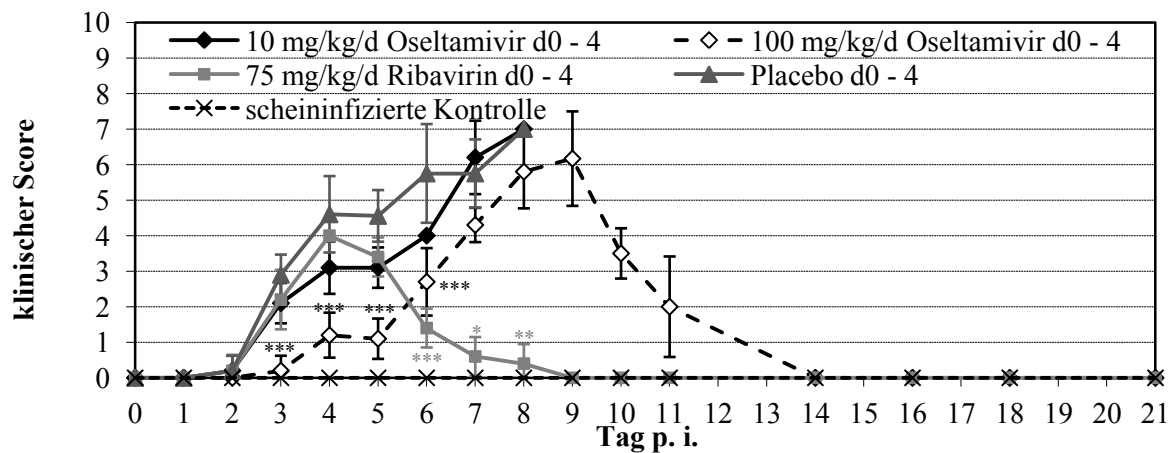


Abbildung 21: Einfluss der Oseltamivir-Behandlung (10 oder 100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) sowie einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf (A) das Überleben, (B) die

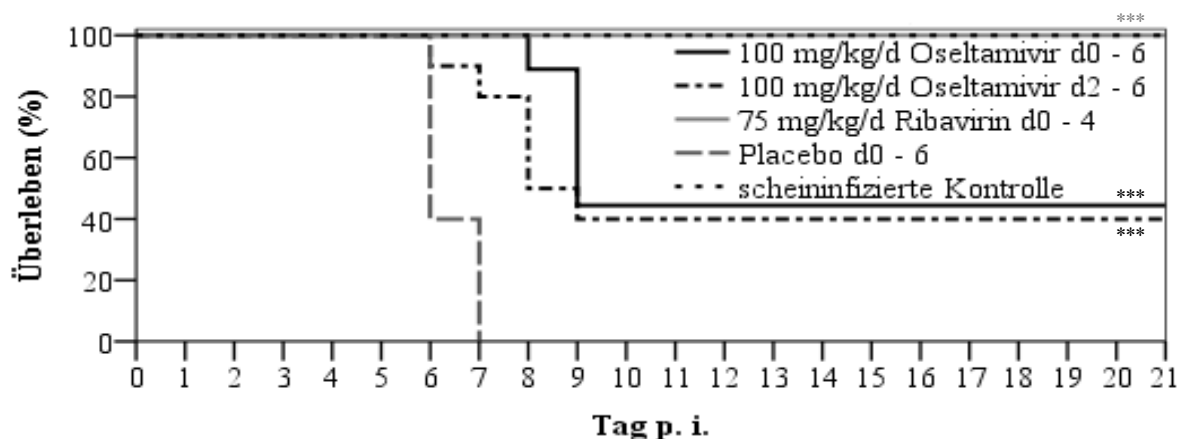
Gewichtsänderung und (C) den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^4 TCID₅₀ mpPotsdam/15 infiziert wurden. Die Gewichtsänderung und der klinische Score sind jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aller noch lebenden Mäuse einer Gruppe für den entsprechenden Tag dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Substanz- und Placebo-behandelten, infizierten Mäusen sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Aufgrund des geringen bzw. nur moderaten Behandlungserfolgs bei einer Gabe von 10 bzw. 100 mg/kg/d Oseltamivir zweimal täglich, über 5 Tage wurde in einem weiteren Experiment eine **auf 7 Tage verlängerte Oseltamivir-Behandlung** untersucht, wobei die erstmalige Behandlung wiederum vier Stunden vor Infektionsbeginn erfolgte. Weiterhin wurde in diesem Versuch **neben der prophylaktischen auch die therapeutische Wirkung von 100 mg/kg/d Oseltamivir** (zweimal täglich, über 5 Tage verabreicht) analysiert. Dabei **begann die Behandlung am Tag 2 p. i.**, wenn üblicherweise bei den infizierten Tieren erste Krankheitszeichen festzustellen waren. Auch in diesem Experiment wurde eine Ribavirin-Gruppe (75 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage verabreicht) als Positivkontrolle mitgeführt. Es erfolgte aber keine Sektion in dieser Behandlungsgruppe am Tag 4 p. i. Für die Infektion der Mäuse wurde erneut eine Virusdosis von 10^4 TCID₅₀ mpPotsdam/15 verwendet. Alle Placebo-Mäuse verstarben bis zum Tag 7 p. i. (Abbildung 22A). Im Gegensatz dazu verbesserten alle Substanzbehandlungen signifikant das Überleben der Mäuse (alle $p < 0,001$). Jedoch resultierte wie im ersten antiviralen Versuch mit mpPotsdam/15 nur die Gabe von Ribavirin in einer Überlebensrate von 100 %. 44 % der Mäuse überlebten die Virusinfektion nach einer 7-tägigen prophylaktischen Behandlung mit 100 mg/kg/d Oseltamivir (Tag 0 bis 6 p. i.) und 40 % überlebten, wenn die Oseltamivir-Behandlung therapeutisch über 5 Tage (Tag 2 bis 6 p. i.) stattfand.

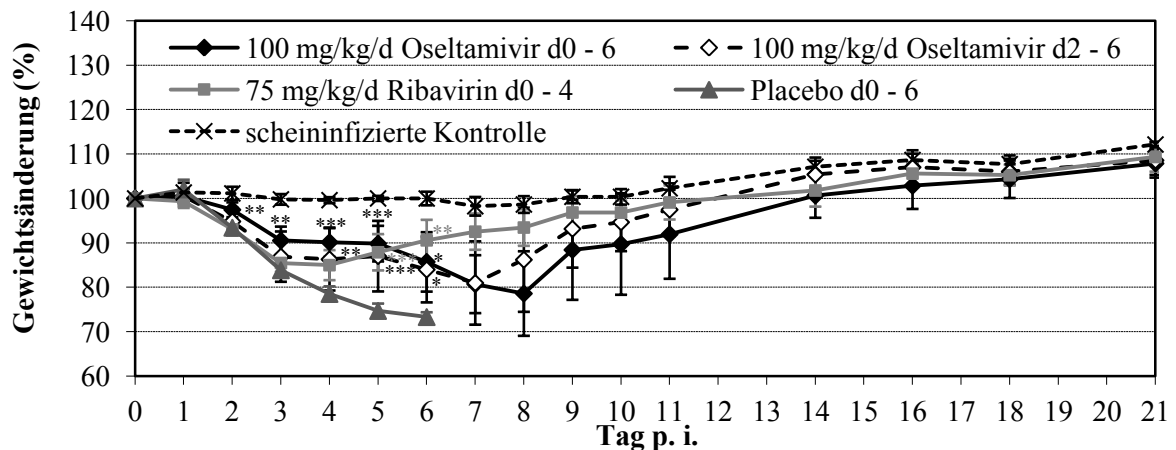
In diesem Versuch konnte der schwere Krankheitsverlauf mpPotsdam/15-infizierter und Placebo-behandelter Mäuse, der sich durch eine schnelle und kontinuierliche Gewichtsabnahme und einen starken Anstieg des klinischen Scores auszeichnete, reproduziert werden (Abbildung 22B und C). Die prophylaktische Oseltamivir-Behandlung von Tag 0 bis 6 p. i. bewirkte am Tag 2 eine schwächere Gewichtsabnahme der Mäuse und begrenzte diese von Tag 3 bis 5 p. i. auf 10 %. Jedoch nahmen die Tiere ab dem darauffolgenden Tag bis zum Tag 8 p. i. (trotz Substanzgabe bis zum Tag 6 p. i.) weiter ab. Ungeachtet dessen war der Gewichtsverlust vom Tag 2 bis 6 p. i. signifikant niedriger als in der Placebo-Gruppe (wegen der hohen Mortalität kein späterer Vergleich mehr möglich). Auch der klinische Score konnte über diesen Zeitraum signifikant gesenkt werden. Während alle übrigen Behandlungsgruppen

bereits am Tag 2 p. i. erste Krankheitszeichen zeigten, war dies durch die prophylaktische Oseltamivir-Gabe erst ab Tag 3 p. i. der Fall. Bis zum Tag 5 p. i. blieb der klinische Score niedrig, stieg dann aber bis zum Tag 8 p. i. stark an. Verglichen dazu wiesen die Mäuse, die erst ab Tag 2 p. i. mit Oseltamivir behandelt wurden, einen sehr ähnlichen Krankheitsverlauf auf. Die Gewichtsabnahme und der Anstieg des klinischen Scores waren in der Anfangsphase der Infektion etwas stärker, blieben jedoch zwischen Tag 3 und 5 p. i. konstant, bevor auch in dieser Gruppe trotz Behandlung bis zum Tag 6 p. i. eine Verschlechterung der Symptome bis zum Tag 7 p. i. beobachtet wurde. Ein signifikanter Effekt auf das Gewicht konnte zwischen Tag 4 und 6 p. i. und auf den klinischen Score am Tag 2, 4 und 5 p. i. festgestellt werden. Die Ribavirin-behandelten Mäuse zeigten den gleichen Krankheitsverlauf wie im vorangegangenen Versuch (Abbildung 22B und C). Der Gewichtsverlust und der klinische Score wurden am Tag 5 und 6 p. i. signifikant gemindert. Somit bestätigte sich die Ribavirin-Wirkung der Substanz in diesem Modell.

A



B



C

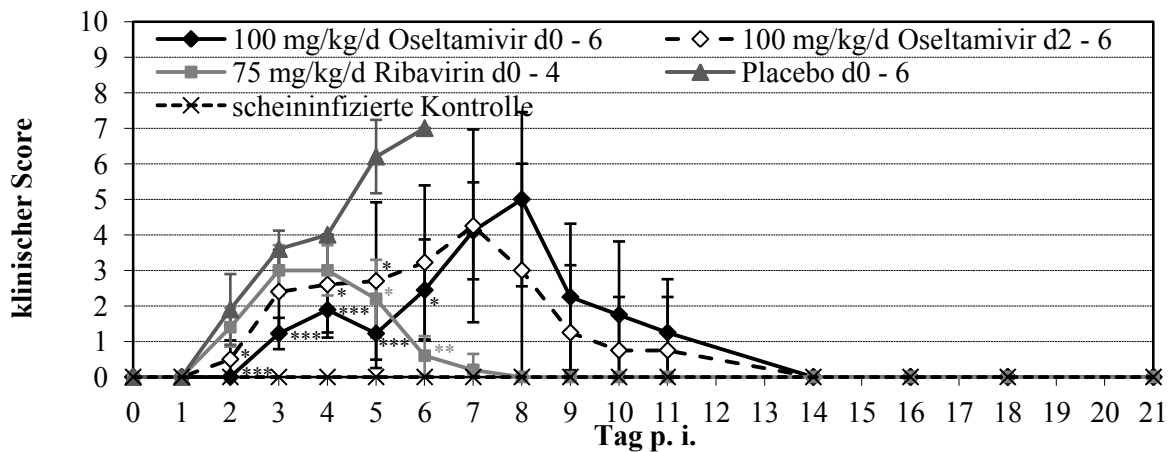


Abbildung 22: Einfluss des Zeitraums der Oseltamivir-Behandlung (100 mg/kg/d, zweimal täglich, prophylaktisch über 7 Tage [d0 - 6], beginnend 4 h vor Infektion oder therapeutisch über 5 Tage [d2 - 6], beginnend 2 d nach Infektion) sowie einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf (A) das Überleben, (B) die Gewichtsänderung und (C) den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^4 TCID₅₀ mpPotsdam/15 infiziert wurden. Die Gewichtsänderung und der klinische Score sind jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aller noch lebenden Mäuse einer Gruppe für den entsprechenden Tag dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Substanz- und Placebo-behandelten, infizierten Mäusen sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Während die prophylaktische Verabreichung von Oseltamivir das Lungengewicht der infizierten Mäuse am Tag 4 p. i. im Vergleich zu den Placebo-Tieren leicht senkte (nicht signifikant, Tabelle 15), zeigte die therapeutische Gabe keine Wirkung. Die später beginnende Oseltamivir-Behandlung konnte sowohl den Lungen- ($p = 0,012$) als auch den Tracheatiter am Tag 4 p. i. um eine Log-Stufe verringern (nicht signifikant) und den histopathologischen Score der Lunge am Tag 4 p. i. reduzieren (nicht signifikant), während die Behandlung von Beginn an keine Wirkung auf diese Parameter hatte. Bei den scheininfizierten Kontrollen waren keine Anzeichen einer Infektion feststellbar.

Tabelle 15: Einfluss der antiviralen Behandlung auf die mittlere Überlebenszeit sowie das Lungengewicht, den Lungen- und Tracheatiter und den histopathologischen Score am Tag 4 p. i. von BALB/c-Mäusen, die mit mpPotsdam/15 infiziert oder scheininfiziert wurden

Infektions- dosis (TCID ₅₀)	Behandlung	mittlere Über- lebenszeit	Sektion Tag 4 p. i. ^a			
			Lungenge- wicht (%) ^b	Lungen- titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g)	Trachea- titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g)	histopatho- logischer Score
10 ⁴	10 Osel d0 - 4	8,40 ± 0,52	0,97 ± 0,01 ***	7,67 ± 0,22	5,65 ± 0,69	1,80 ± 0,55
	100 Osel d0 - 4	11,70 ± 4,92 **	0,89 ± 0,04 ***	7,65 ± 0,26	4,91 ± 0,69	2,00 ± 0,00
	75 Riba d0 - 4	> 21,00 ***	0,94 ± 0,03 ***	6,00 ± 0,38 ***	5,63 ± 0,65	1,60 ± 0,55 *
	Placebo d0 - 4	7,30 ± 1,57	1,38 ± 0,21	7,57 ± 0,53	6,12 ± 0,60	2,80 ± 0,55
scheininf.	Placebo d0 - 4	> 21,00	0,64 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10 ⁴	100 Osel d0 - 6	14,22 ± 6,44 *	0,91 ± 0,08	7,27 ± 0,25	5,71 ± 0,87	1,80 ± 0,45
	100 Osel d2 - 6	13,00 ± 6,92 *	1,08 ± 0,25	6,30 ± 0,71 *	4,95 ± 0,53	1,20 ± 0,45
	75 Riba d0 - 4	> 21,00 ***	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
	Placebo d0 - 6	6,40 ± 0,52	1,23 ± 0,28	7,34 ± 0,34	6,07 ± 0,51	2,40 ± 0,89
scheininf.	Placebo d0 - 6	> 21,00	0,74 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

^a Da die Mäuse bereits am Tag 4 p. i. seziert wurden, war eine Behandlung darüber hinaus nicht möglich.

^b Das Lungengewicht ist als prozentualer Anteil vom Gesamtgewicht der Mäuse am Tag 4 p. i. angegeben.

10 Osel = 10 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Osel = 100 mg/kg/d Oseltamivir; 75 Riba = 75 mg/kg/d Ribavirin; d = Tag; scheininf. = scheininfiziert; n. u. = nicht untersucht; Signifikanz im Vergleich zu den infizierten, Placebo-behandelten Mäusen: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Die histologischen Lungenschnitte mpPotsdam/15-infizierter Placebo-Mäuse wiesen verglichen mit den scheininfizierten Kontrolltieren am Tag 4 p. i. großflächige Veränderungen auf, die durch massive Infiltrationen von Immunzellen aber auch Ödemen und Hämorrhagien gekennzeichnet waren und sich von den Bronchien und Bronchiolen ausgehend weit in das umgebende Lungengewebe erstreckten (Abbildung 23). Die Lungen aller Oseltamivir-behandelten Mäuse zeigten vergleichbare histopathologische Veränderungen, jedoch war die Ausbreitung in das alveoläre Gewebe leicht eingeschränkt, was auch an den etwas niedrigeren Scorewerten erkennbar war (nicht signifikant). Den

deutlichsten Effekt, der auch in einer signifikanten Senkung des histopathologischen Scores resultierte, erzielte die Ribavirin-Behandlung, indem sie die Veränderungen am stärksten eingrenzte.

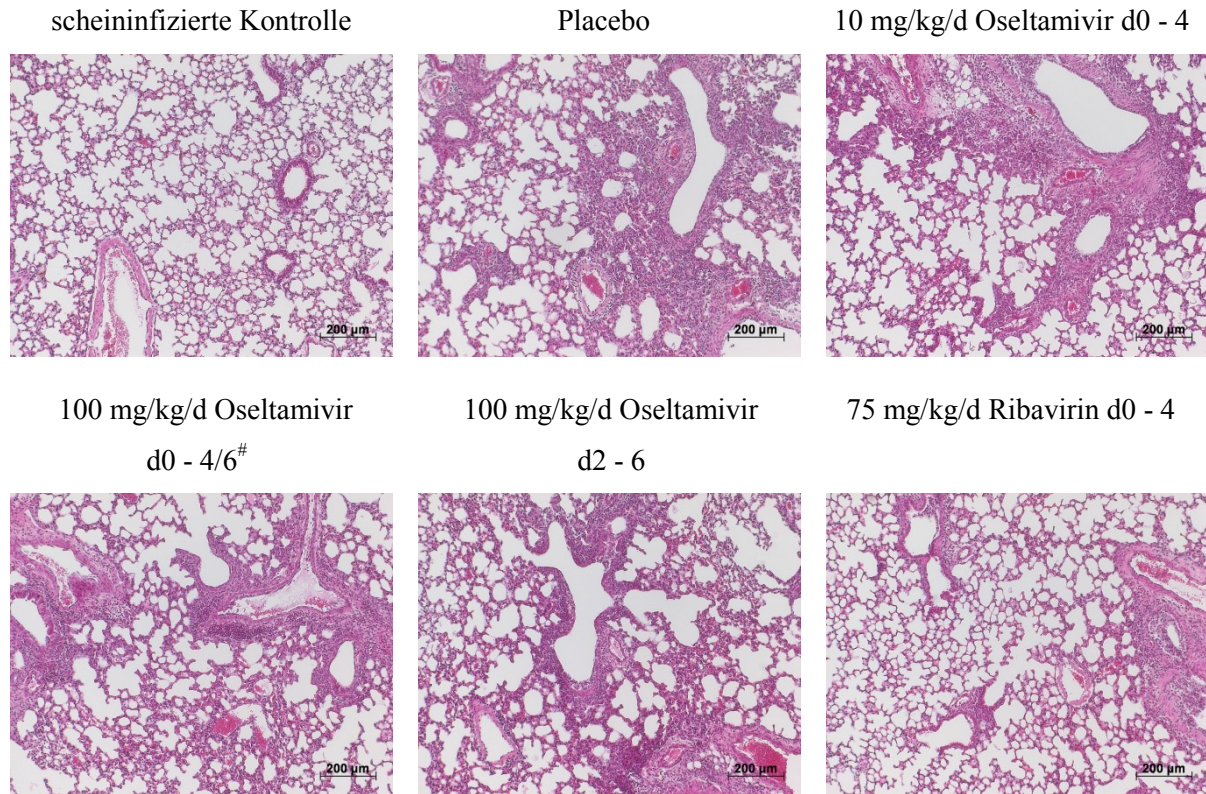


Abbildung 23: Einfluss der Oseltamivir- und Ribavirin-Behandlung auf die Lungenhistopathologie mpPotsdam/15-infizierter Mäuse am Tag 4 p. i. Die Mäuse wurden scheininfiziert oder mit einer Virusdosis von 10^4 TCID₅₀ infiziert und mit dem Placebo, verschiedenen Oseltamivir-Konzentrationen oder Ribavirin behandelt. Die Behandlung erfolgte über den jeweils angegebenen Zeitraum bis maximal zum Tag 4 p. i., da an diesem Tag die Sektion erfolgte. Die Angabe des kompletten Behandlungszeitraums dient der Zuordnung in die unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Lungenschnitte wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt. # Weil sich die Behandlung der Mäuse bis zum Tag 4 p. i. nicht unterschied, wurden diese Gruppen zusammengefasst.

Zusammenfassung

Der Vergleich aller Studienparameter der mpPotsdam/15-infizierten, Placebo-behandelten Mäuse aus beiden Versuchen ergab eine hohe Übereinstimmung (Abbildung 21 und 22, Tabelle 15).

Die Oseltamivir-Behandlung mit 100 mg/kg/d vom Tag 0 bis 4 p. i. sowie vom Tag 0 bis 6 p. i. und vom Tag 2 bis 6 p. i. verbesserten das Überleben der Mäuse und die mittlere Überlebenszeit signifikant (Tabelle 16). Eine verlängerte Oseltamivir-Verabreichung

verhinderte jedoch nicht die Verschlechterung der Krankheitssymptome ab Tag 6 p. i. Der Vergleich weiterer Untersuchungsparameter nach der Sektion am Tag 4 p. i. ergab ebenfalls eine gute Übereinstimmung im Behandlungseffekt zwischen den beiden prophylaktisch mit 100 mg/kg/d Oseltamivir behandelten Gruppen (Tabelle 15). Lediglich die therapeutische Verabreichung von Oseltamivir hatte einen signifikanten Effekt auf den Lungentiter am Tag 4 p. i.

Die beste Wirkung auf den Krankheitsverlauf und die am Tag 4 p. i. ermittelten Lungenwerte zeigte die Gabe von 75 mg/kg/d Ribavirin (Tabelle 16). Somit konnte der positive Effekt dieser Substanz auch für mpPotsdam/15-infizierte BALB/c-Mäuse bestätigt werden.

Tabelle 16: Zusammenfassung der antiviralen Wirkung von Oseltamivir und Ribavirin in mpPotsdam/15 infizierten BALB/c-Mäusen (10^4 TCID₅₀).

Parameter	10^4 TCID ₅₀ /Maus				
	10 Osel	100 Osel	100 Osel	100 Osel	75 Riba
	d0 - 4	d0 - 4	d0 - 6	d2 - 6	d0 - 4
Überleben	kein Einfluss	signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
Körpergewichtsänderung	kein Einfluss	signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
mittlere Überlebenszeit	kein Einfluss	signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
klinischer Score	nicht sig.	signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
Lungengewicht d4 p. i.	signifikant	signifikant	nicht sig.	kein Einfluss	signifikant
Lungentiter d4 p. i.	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss	signifikant	signifikant
Tracheatiter d4 p. i.	kein Einfluss	nicht sig.	kein Einfluss	nicht sig.	kein Einfluss
histopathologischer Score d4 p. i.	nicht sig.	nicht sig	kein Einfluss	nicht sig	signifikant

10 Osel = 10 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Osel = 100 mg/kg/d Oseltamivir; 75 Riba = 75 mg/kg/d Ribavirin; d = Tag

signifikant $p < 0,05$; nicht sig. = nicht signifikant $0,1 > p > 0,05$, Tendenz zur Signifikanz erkennbar; kein Einfluss $p > 0,1$

4.4.2 Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin in HA-G222-mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen

Vor der Untersuchung im Mausmodell wurde die NAI- und Ribavirin-Wirkung der Plaquegereinigten Virusvariante HA-G222-mpJean/5258 *in vitro* bestätigt (Tabelle 17). Zudem wurden anhand der Sequenzierung des NA-Segments von HA-G222-mpJena/5258 Substitutionen im Vergleich zu mpJena/5258 ausgeschlossen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 17: NAI- und Ribavirin-Empfindlichkeit von HA-G222-mpJena/5258 in einem Enzym- und einem Zell-basierten Test

Virus	IC ₅₀ NA-Hemmtest		IC ₅₀ zpE-Hemmtest		
	Oseltamivir	Zanamivir	Oseltamivir	Zanamivir	Ribavirin
	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)	(μM)
HA-G222- mpJena/5258	0,23 ± 0,05	0,25 ± 0,04	7,71 ± 2,31	15,73 ± 7,32	97,19 ± 40,29

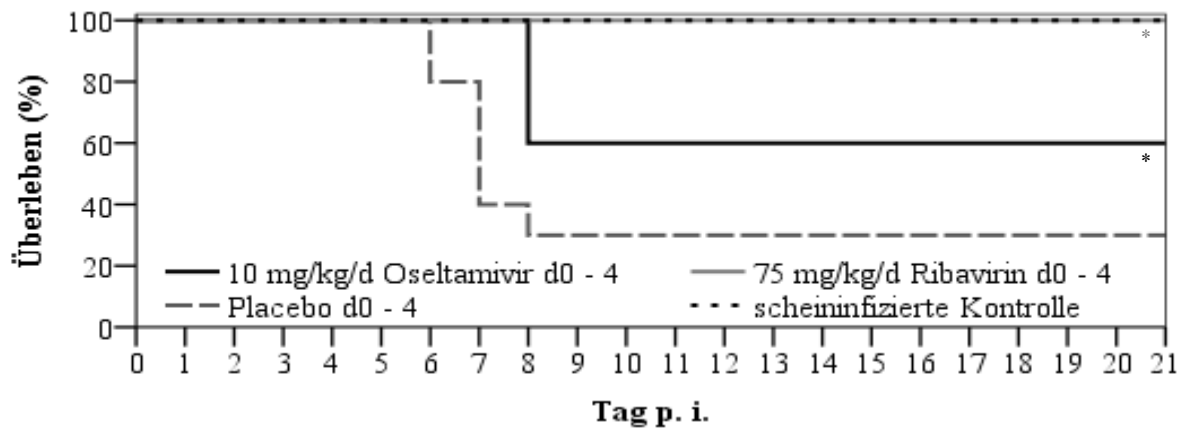
Für die Infektion von BALB/c-Mäusen mit HA-G222-mpJena/5258 wurde eine Virusdosis von 10⁶ TCID₅₀ (analog zu mpJena/5258) ausgewählt, um den Effekt der Behandlung besser vergleichen zu können. In einem ersten Versuch wurde die **prophylaktische Wirkung von 10 mg/kg/d Oseltamivir und von 75 mg/kg/d Ribavirin** (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, über 5 Tage, zweimal täglich verabreicht) analysiert.

Während 70 % der Placebo-Mäuse zwischen Tag 6 und 8 p. i. verstarben, überlebten 60 % der Oseltamivir-behandelten Tiere die Infektion (p = 0,048; Abbildung 24A). Die Oseltamivir-Gabe verlängerte die mittlere Überlebenszeit im Vergleich zur Placebo-Gruppe, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (Tabelle 18). Durch die Verabreichung von Ribavirin überlebten alle infizierten Mäuse (p = 0,018). Die Placebo-behandelten Mäuse verloren vom Tag 2 p. i. bis zum Tag 6 p. i. kontinuierlich an Gewicht. Danach erholten sich die überlebenden Mäuse (Abbildung 24B). Die Oseltamivir-behandelten Tiere nahmen bis Tag 3 p. i. genauso ab wie die Placebo-Mäuse, konnten ihr Gewicht jedoch dann bis zum Tag 5 p. i. konstant halten, bevor es schließlich am Tag 7 p. i. ein Minimum erreichte. Die Ribavirin-behandelten Mäuse verloren bis zum Tag 5 p. i. an Gewicht und erholten sich im Anschluss. Keine der antiviralen Behandlungen zeigte eine signifikante Wirkung auf das Gewicht.

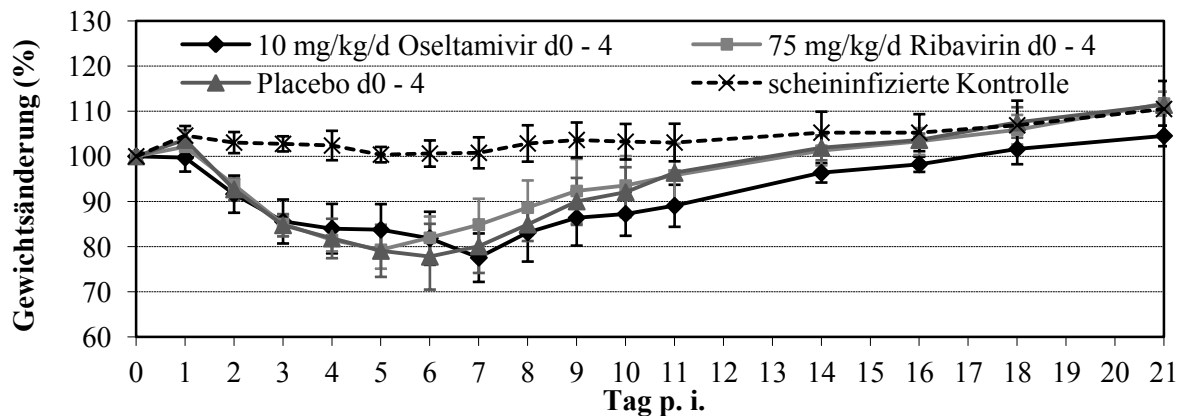
In der Placebo-Gruppe waren am Tag 2 p. i. bereits deutliche Krankheitssymptome zu beobachten, die bis zum Tag 6 p. i. weiter zunahmen und dann allmählich bis zum Tag 14 p. i. abklangen (Abbildung 24C). Die Oseltamivir-behandelten Mäuse wiesen am Tag 2 und 3 einen signifikant schwächeren Anstieg des klinischen Scores auf. Am Tag 4 p. i. war kein Unterschied zu den Placebo-Mäusen mehr festzustellen. Weil sich die Symptome der Placebo-Mäuse in den beiden folgenden Tagen stark verschlechterten und in den Oseltamivir-behandelten Tieren ein leicht verbesserter Score festzustellen war, unterschieden sich die Gruppen an diesen Tagen erneut signifikant voneinander. Jedoch stieg der Score am Tag 7 p. i. deutlich an und nahm anschließend etwas schneller als in der Placebo-Gruppe ab. In den Mäusen, welche Ribavirin verabreicht bekamen, war bis zum Tag 3 p. i. ein ähnlicher Anstieg

der Symptome wie in den Placebo-Tieren zu beobachten. Der Score blieb dann aber bis zum Tag 5 p. i. konstant bei 4,0 und sank anschließend wieder ab. Trotz der niedrigeren Scorewerte und einer schnelleren Erholung der Ribavirin-behandelten Mäuse war nur am Tag 6 p. i. ein signifikanter Unterschied gegenüber den Placebo-Mäusen zu ermitteln.

A



B



C

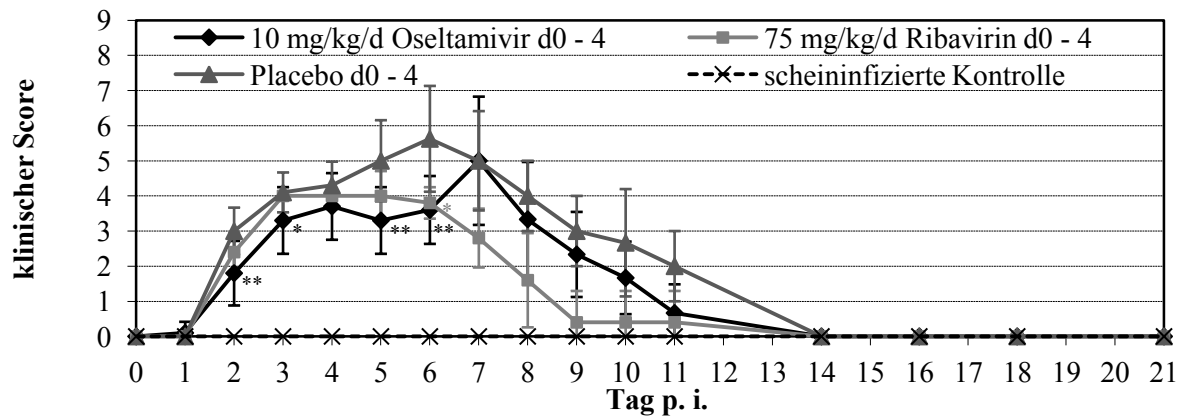


Abbildung 24: Einfluss einer Oseltamivir- (10 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) und einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5

Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf (A) das Überleben, (B) die Gewichtsänderung und (C) den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^6 TCID₅₀ HA-G222-mpJena/5258 infiziert wurden. Die Gewichtsänderung und der klinische Score sind jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aller noch lebenden Mäuse einer Gruppe für den entsprechenden Tag dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Substanz- und Placebo-behandelten, infizierten Mäusen sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Die Untersuchung der Lungengewichte und der Tracheatiter nach der Sektion am Tag 4 p. i. ergab keinen Einfluss durch die Behandlung mit Oseltamivir oder Ribavirin (Tabelle 18). Die Gabe von Oseltamivir hatte ebenfalls keine Wirkung auf den Lungentiter, während die Ribavirin-Behandlung den Titer um 1,7 Log-Stufen signifikant senkte ($p < 0,001$). Zusätzlich reduzierte Ribavirin den histopathologischen Score leicht (nicht signifikant). Für die Oseltamivir-Behandlung wurde kein Effekt auf diesen Parameter festgestellt.

Bei der Sequenzierung des HA aus Lungen- und Tracheamaterial zweier zufällig ausgewählter Placebo-Mäuse, die am Tag 4 p. i. sezirt wurden, war ausschließlich ein HA-G222 nachweisbar war (Ergebnisse nicht gezeigt).

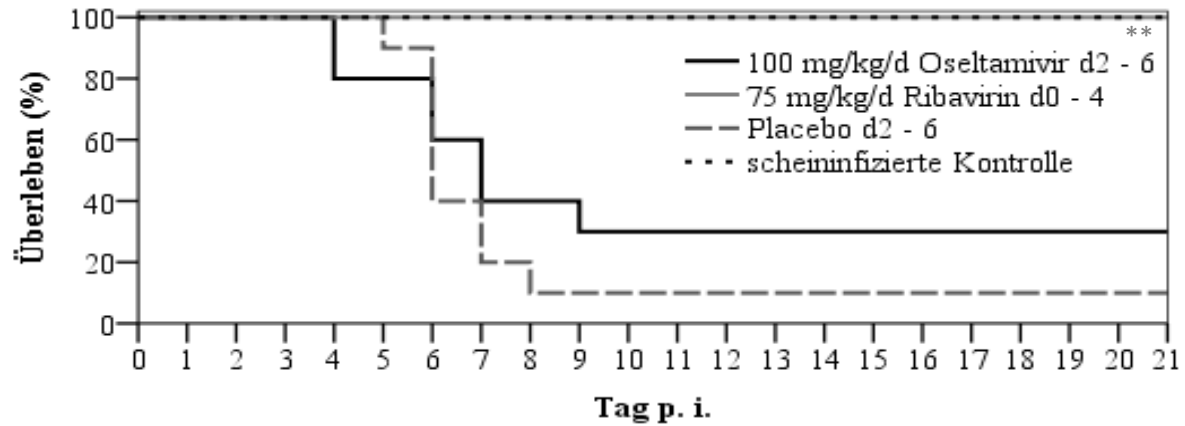
In einem zweiten Experiment wurde anschließend geprüft, ob eine **erhöhte Dosierung von 100 mg/kg/d Oseltamivir eine therapeutische Wirkung** (Behandlungsbeginn zwei Tage nach Infektion, über 5 Tage, zweimal täglich verabreicht) gegenüber HA-G222-mpJena/5258 (10^6 TCID₅₀) besitzt. Eine Ribavirin-behandelte Gruppe (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, über 5 Tage, zweimal täglich verabreicht), von der keine Mäuse am Tag 4 p. i. sezirt wurden, diente wiederum als Positivkontrolle.

Während 10 % der Placebo-Tiere und 30 % der Oseltamivir-behandelten Mäuse die Infektion mit HA-G222-mpJena/5258 überlebten (kein Einfluss), war in der Ribavirin-Gruppe keine Mortalität festzustellen ($p = 0,002$, Abbildung 25A). Ribavirin verlängerte zudem signifikant die Überlebenszeit ($p < 0,001$, Tabelle 18).

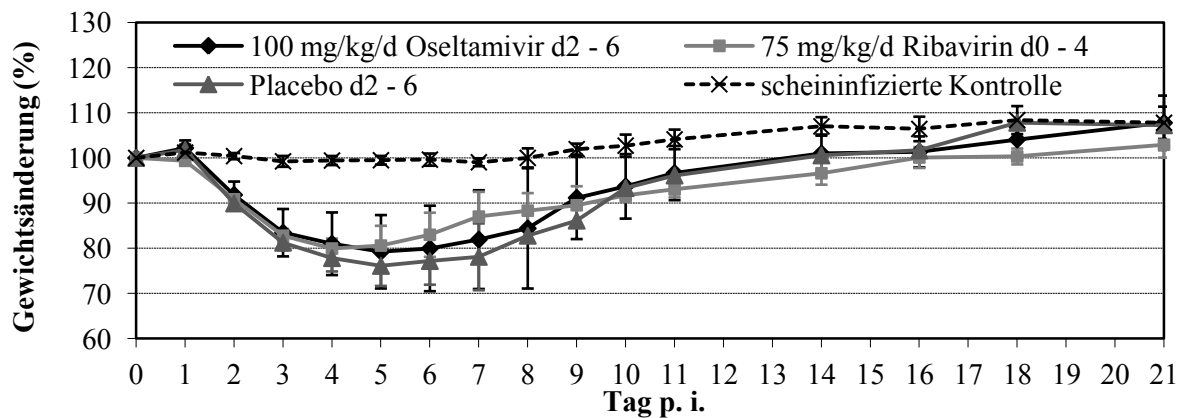
Die Infektion resultierte in der Placebo-Gruppe in einer vergleichbaren Symptomatik wie im vorangegangenen Versuch (Abbildung 24B, C und 25B, C). Die Gewichtsabnahme und die Zunahme des klinischen Scores erfolgten aber etwas schneller, sodass eine maximale Gewichtsabnahme von 23,9 % bereits am Tag 5 p. i. erreicht wurde (Abbildung 25B und C). Die Oseltamivir-behandelten Mäuse nahmen im Mittel maximal 20,8 % ab (kein Einfluss). Der klinische Score dieser Versuchsgruppe lag während der Behandlung unter dem der Placebo-behandelten Tiere (nicht signifikant) und stieg danach am Tag 8 p. i. leicht an, bevor er schließlich abfiel. Die Gewichtsänderung der Ribavirin-Gruppe zeigte einen vergleichbaren

Verlauf wie im ersten Versuch. Der klinische Score der Tiere verbesserte sich jedoch früher und unterschied sich an den Tagen 2 und 4 bis 6 p. i. signifikant von den Placebo-Mäusen.

A



B



C

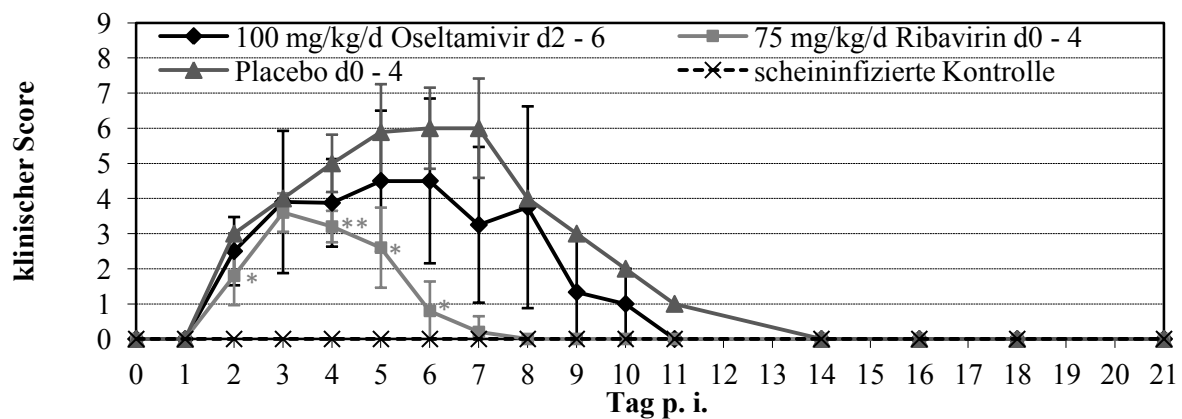


Abbildung 25: Einfluss einer Oseltamivir- Behandlung mit verzögertem Behandlungsbeginn (100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d2 - 6], beginnend 2d nach Infektion) und einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf (A) das Überleben, (B) die Gewichtsänderung und (C) den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit

einer Virusdosis von 10^6 TCID₅₀ HA-G222-mpJena/5258 infiziert wurden. Die Gewichtsänderung und der klinische Score sind jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aller noch lebenden Mäuse einer Gruppe für den entsprechenden Tag dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Substanz- und Placebo-behandelten, infizierten Mäusen sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Tabelle 18: Einfluss der antiviralen Behandlung auf die mittlere Überlebenszeit sowie das Lungengewicht, den Lungen- und Tracheatiter und den histopathologischen Score am Tag 4 p. i. von BALB/c-Mäusen, die mit HA-G222-mpJena/5258 infiziert oder scheininfiziert wurden

Infektions- dosis (TCID ₅₀)	Behandlung	mittlere Über- lebenszeit	Sektion Tag 4 p. i. ^a			
			Lungenge- wicht (%) ^b	Lungen- titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g)	Trachea- titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g)	histopatho- logischer Score
10^6	10 Osel d0 - 4	15,80 ± 6,71	1,03 ± 0,27	6,98 ± 0,37	3,61 ± 2,15	1,60 ± 0,55
	75 Riba d0 - 4	> 21,00 *	1,16 ± 0,49	5,29 ± 0,40 ***	5,23 ± 1,98	1,00 ± 1,00
	Placebo d0 - 4	11,10 ± 6,85	1,14 ± 0,24	7,02 ± 0,26	4,85 ± 0,50	2,00 ± 0,00
scheininf.	Placebo d0 - 4	> 21,00	0,70 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10^6	100 Osel d2 - 6	10,60 ± 7,32	1,52 ± 0,43	6,30 ± 0,33 *	4,67 ± 0,64	2,00 ± 0,71
	75 Riba d0 - 4	> 21,00 ***	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
	Placebo d2 - 6	7,80 ± 4,71	1,62 ± 0,52	6,68 ± 0,18	5,07 ± 0,60	2,20 ± 0,45
scheininf.	Placebo d0 - 6	> 21,00	0,64 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

^a Da die Mäuse bereits am Tag 4 p. i. seziiert wurden, war eine Behandlung darüber hinaus nicht möglich.

^b Das Lungengewicht ist als prozentualer Anteil vom Gesamtgewicht der Mäuse am Tag 4 p. i. angegeben.

10 Osel = 10 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Osel = 100 mg/kg/d Oseltamivir; 75 Riba = 75 mg/kg/d Ribavirin; d = Tag; scheininf. = scheininfiziert; n. u. = nicht untersucht; Signifikanz im Vergleich zu den infizierten, Placebo-behandelten Mäusen: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Die Oseltamivir-Behandlung hatte keine Wirkung auf die am Tag 4 p. i. festgestellten Lungengewichte, den Tracheatiter und den histopathologischen Score (Tabelle 18). Das mittlere Lungengewicht der Placebo-Mäuse war etwas höher als im ersten antiviralen Versuch mit HA-G222-mpJena/5258. Für alle übrigen Parameter wiesen die beiden Placebo-Gruppen vergleichbare Werte auf. Die Sektion am Tag 4 p. i. ergab eine signifikante Senkung des Lungentiters um 0,4 Log-Stufen ($p = 0,027$) durch die therapeutische Verabreichung von 100 mg/kg/d Oseltamivir.

Die Lungenschnitte der HA-222G-mpJena/5258-infizierten Placebo-Mäuse wiesen am Tag 4 p. i. große und bereits stark konsolidierte Veränderungen um die Bronchien und Bronchiolen auf (Abbildung 26). Die Verabreichung von 10 mg/kg/d Oseltamivir vom Tag 0 bis 4 p. i. bzw. die Gabe von 100 mg/kg/d Oseltamivir vom Tag 2 bis 6 p. i. führte nicht zu einer signifikanten Verbesserung. Im Gegensatz dazu resultierte die Ribavirin-Behandlung in einer Eingrenzung der Veränderungen auf die Bereiche um die Luftgefäße.

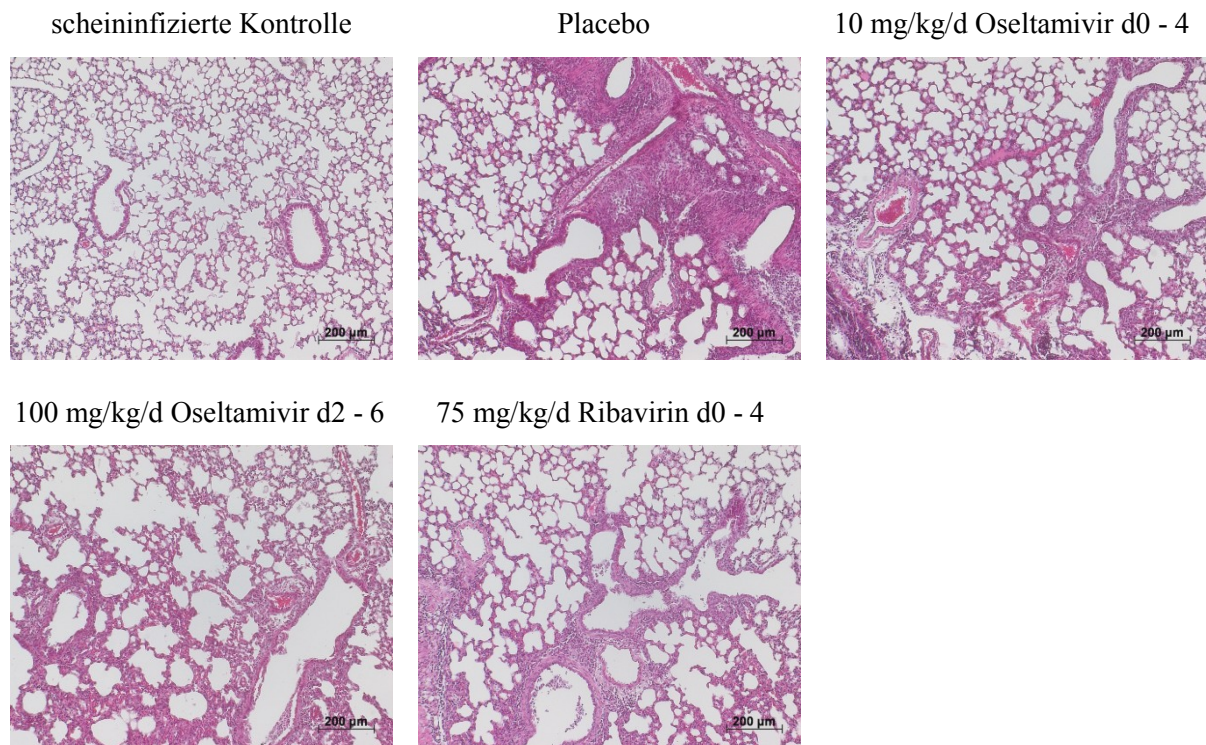


Abbildung 26: Einfluss der Oseltamivir- und Ribavirin-Behandlung auf die Lungenhistopathologie HA-G222-mpJena/5258-infizierter Mäuse am Tag 4 p. i. Die Mäuse wurden scheininfiziert oder mit einer Virusdosis von 10^6 TCID₅₀ infiziert und mit dem Placebo, verschiedenen Oseltamivir-Konzentrationen oder Ribavirin behandelt. Die Behandlung erfolgte über den jeweils angegebenen Zeitraum bis maximal zum Tag 4 p. i., da an diesem Tag die Sektion erfolgte. Die Angabe des kompletten Behandlungszeitraums dient der Zuordnung in die unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Lungenschnitte wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Zusammenfassung

HA-G222-mpJena/5258 rief in BALB/c-Mäusen eine schwere Erkrankung mit einer kontinuierlichen Zunahme der Symptome hervor. Die prophylaktische Gabe von 10 mg/kg/d Oseltamivir von Tag 0 bis 4 p. i. verbesserte signifikant das Allgemeinbefinden und das Überleben sowie leicht, aber nicht signifikant, das Körpergewicht und die mittlere Überlebenszeit (Tabelle 19). Die therapeutische Verabreichung der 10-fach höheren

Substanzkonzentration vom Tag 2 bis 6 p. i. hatte eine signifikante Wirkung auf den Lungentiter und einen leichten, nicht signifikanten Effekt auf den klinischen Score. Die therapeutische Gabe von 75 mg/kg/d Ribavirin über 5 Tage beeinflusste das Überleben, die mittlere Überlebenszeit, den klinischen Score und den Lungentiter signifikant.

Tabelle 19: Zusammenfassung der antiviralen Wirkung von Oseltamivir und Ribavirin in HA-G222-mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen (10^6 TCID₅₀).

Parameter	10^6 TCID ₅₀ /Maus		
	10 Osel d0 - 4	100 Osel d2 - 6	75 Riba d0 - 4
Überleben	signifikant	kein Einfluss	signifikant
Körpergewichtsänderung	nicht signifikant	kein Einfluss	nicht signifikant
mittlere Überlebenszeit	nicht signifikant	kein Einfluss	signifikant
klinischer Score	signifikant	nicht signifikant	signifikant
Lungengewicht d4 p. i.	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss
Lungentiter d4 p. i.	kein Einfluss	signifikant	signifikant
Tracheatiter d4 p. i.	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss
histopathologischer Score d4 p. i.	kein Einfluss	kein Einfluss	nicht signifikant

10 Osel = 10 mg/kg/d Oseltamivir; 100 Osel = 100 mg/kg/d Oseltamivir; 75 Riba = 75 mg/kg/d Ribavirin; d = Tag

signifikant $p < 0,05$; nicht signifikant $0,1 > p > 0,05$, Tendenz zur Signifikanz erkennbar; kein Einfluss $p > 0,1$

5 Diskussion

Die letzte Influenzapandemie in der Saison 2009/10 wurde durch ein mehrfach reassortiertes H1N1-Virus mit porzinem Ursprung ausgelöst (Garten et al. 2009). In den ersten zwölf Monaten kam es weltweit zu geschätzt 201.200 respiratorischen und 83.300 kardiovaskulären Todesfällen im Zusammenhang mit A(H1N1)pdm09-Infektionen (Dawood et al. 2012). Eine Vielzahl an Publikationen diskutiert eine Assoziation zwischen schweren und fatal verlaufenden Erkrankungen und dem Auftreten der HA-D222G bzw. einem Polymorphismus an der HA-222 in Patientenisolaten (Chen et al. 2010, Mak et al. 2010, Miller et al. 2010, Vazquez-Perez et al. 2013, Kilander et al. 2010). Studien in der Maus, dem wichtigsten Modelltier in der Influenzaforschung (Barnard 2009, Bouvier und Lowen 2010), konnten bisher nicht eindeutig belegen, dass die HA-D222G zu einer erhöhten Pathogenität führt (Abed et al. 2011b, Seyer et al. 2012, Xu et al. 2010, Zheng et al. 2010, Chutinimitkul et al. 2010).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse tragen dazu bei, die Bedeutung des HA-222D/G-Polymorphismus für die Evolution von A(H1N1)pdm09-Viren im Wirt besser zu verstehen. Sie belegen zudem, dass ein HA-G222 mit einer erhöhten Pathogenität in BALB/c-Mäusen assoziiert ist. Weiterhin gelang der experimentelle Nachweis, dass die HA-222 einen Einfluss auf den therapeutischen Effekt von NAI *in vivo* besitzt.

5.1 Die Bedeutung der HA-222 für die Evolution und die Pathogenität von H1N1-IAV im Mausmodell

5.1.1 Der HA-222D/G-Polymorphismus ermöglicht eine schnelle Evolution von A(H1N1)pdm09 in BALB/c-Mäusen

Die Infektion von BALB/c-Mäusen mit 10^6 TCID₅₀ mpJena/5258 verursachte eine in zwei Phasen verlaufende Erkrankung (Abbildung 11), was bei mpPotsdam/15-infizierten Mäusen (10^4 TCID₅₀) nicht beobachtet wurde (Abbildung 12). Dies bestätigt zuvor erhobene Befunde (Seidel 2011, Topf 2010).

Die Infektion von BALB/c-Mäusen mit mpJena/5258 bot die Möglichkeit, die Ursache für den biphasischen Krankheitsverlauf experimentell aufzuklären. Zunächst wurde gezeigt, dass den Symptommöhepunkten am Tag 4 und 7 p. i. jeweils hohe Titer in der Lunge und der Trachea am Tag 2 und 6 p. i. vorausgingen (Abbildung 11). Somit lag eine Korrelation dieser

Parameter nahe. Weiterhin wurde festgestellt, dass am Tag 2 p. i. der Lungentiter signifikant höher war als der Tracheatiter und sich dieses Verhältnis am Tag 6 p. i. umkehrte. Dies deutete auf eine Änderung des Organotropismus während der Replikation des Virus hin. Die Sequenzierung von Lungen- und Tracheaprobe ergab, dass mpJena/5258 einen HA-222D/G-Polymorphismus aufwies. Dieser Polymorphismus wurde bereits vielfach in A(H1N1)pdm09-Patientenisolaten nachgewiesen (Chen et al. 2010, Kilander et al. 2010, Mak et al. 2010, Miller et al. 2010, Wang et al. 2011, Wedde et al. 2013). In der vorliegenden Dissertation wurde jedoch erstmalig mittels Sequenzanalyse gezeigt, dass sich der Anteil der HA-G222- und der HA-D222-Virusvariante in der Lunge und der Trachea von mpJena/5258-infizierten Mäusen vom Tag 1 bis 7 p. i. veränderte (Abbildung 13 und 14). Während in der Lunge die HA-D222-Variante dominant blieb, setzte sich in der Trachea am Tag 5 p. i. die HA-G222-Variante durch.

Die HA-G222-Variante war mittels Sanger-Sequenzierung in Lungenproben einer ersten Mauspassage mit dem Ausgangsvirus Jena/5258 am Tag 4 p. i. und auch nach der Passagierung auf MDCK-Zellen (Herstellung von mpJena/5258) nicht nachweisbar. Aus diesem Grund wurde zunächst angenommen, dass es sich bei mpJena/5258 um eine reine HA-D222-Variante handelt (Seidel 2011). Die Sequenzierung von Tracheaprobe Jena/5258-infizierter Mäuse ergab jedoch, dass sich die HA-G222-Variante in zwei von drei untersuchten Tieren bereits bei der ersten Mauspassage durchsetzte (Tabelle 11). Durch eine erneute Passage des Virus in der Maus (Infektion mit mpJena/5258) war es schließlich möglich, die HA-G222-Variante als Subpopulation auch in Lungenproben mithilfe der Sanger-Sequenzierung zu detektieren (Abbildung 13). Somit wurde erst nachträglich festgestellt, dass das Isolat mpJena/5258 sowie das Ausgangsvirus Jena/5258 einen HA-222D/G-Polymorphismus aufwiesen. Die für diese Untersuchungen verwendete Sanger-Sequenzierung erschwerte aufgrund ihrer geringen Sensitivität gegenüber kleinen Subpopulationen die Detektion des Polymorphismus (Selleri et al. 2013). Die Pyrosequenzierung (Duwe und Schweiger 2008) und die *Next-Generation*-Sequenzierung (Kuroda et al. 2010) stellen sensiblere und damit geeignetere Methoden für die Untersuchung von Quasispezies dar.

Bereits Jena/5258-infizierte Mäuse (10^6 TCID₅₀) wiesen einen biphasischen Krankheitsverlauf auf (Manchanda et al. 2014, Seidel 2011). Dieser war jedoch stärker ausgeprägt als der mpJena/5258-infizierter Mäuse (10^6 TCID₅₀; Abbildung 11). Die Untersuchung der individuellen Kurven der Körpergewichtsänderung und des klinischen Scores ergaben, dass hauptsächlich jene mpJena/5258-infizierten Tiere, die wegen eines zu

hohen Gewichtsverlusts abgetötet werden mussten, eine schwere Erkrankung mit einer kontinuierlichen Verschlechterung dieser Parameter aufwiesen. Im Gegensatz dazu war der Krankheitsverlauf der überlebenden Mäuse überwiegend biphasisch (Seidel et al. 2014). Ein Vergleich des Anteils der HA-222-Varianten in Lungenproben Jena/5258- (Tabelle 11) und mpJena/5258-infizierter Mäuse am Tag 4 p. i (Abbildung 13) ergab eine Zunahme der HA-G222-Variante durch die Mauspassagierung. Da für diese Variante eine gesteigerte Pathogenität diskutiert wird (vgl. 5.1.2), kann deren Akkumulation ursächlich für die kontinuierliche Symptomzunahme und den fatalen Verlauf in einigen mpJena/5258-infizierten Mäusen gewesen sein.

Auch für andere A(H1N1)pdm09-Infektionen wurden im Mausmodell biphasische Gewichtsänderungen beschrieben (Hamelin et al. 2010, Sakabe et al. 2011, Seyer et al. 2012, Vazquez-Perez et al. 2013, Uraki et al. 2013, Abed et al. 2011b). Hayden et al. (1999) berichteten zudem über den biphasischen Verlauf nasaler Virustiter und des Symptomscores nach der experimentellen Infektion von Menschen mit einem saisonalen H1N1-Virus. Die Ursache dieser Beobachtungen blieb jedoch ungeklärt. Basierend auf bioinformatischen Modellen wurde vermutet, dass eine überschießende Immunantwort die biphasisch verlaufenden, schweren Erkrankungen verursacht (Baccam et al. 2006). Auf Grundlage dieser Annahme wurde für das Ausgangsvirus Jena/5258 ein vereinfachtes mathematisches Modell anhand von Daten zum Verlauf des klinischen Scores erstellt (Manchanda et al. 2014). Mithilfe der Gleichungen war es möglich, die in zwei Phasen verlaufende, durch Jena/5258 ausgelöste Erkrankung zu beschreiben, wobei eine starke Virus-induzierte Inflammation als Auslöser für die zweite Erkrankungsphase identifiziert wurde. Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen ergaben, dass bereits das Isolat Jena/5258 den HA-222D/G-Polymorphismus aufwies. Somit ist naheliegend, dass dieser Polymorphismus, wie für mpJena/5258 gezeigt, die Ursache des biphasischen Krankheitsverlaufs darstellt und damit die Ausgangshypothese, die der Modellierung zugrunde lag, nicht zutreffend war. Inwiefern der Anstieg der HA-G222-Variante im Verlauf der Infektion trotzdem einen Einfluss auf die Immunantwort und damit auf den biphasischen Verlauf hatte, soll mithilfe einer Transkriptomanalyse von Lungenproben mpJena/5258-infizierter Mäuse geklärt werden.

Das im Vergleich zu mpJena/5258 untersuchte porcine H1N1-Virus mpPotsdam/15 verursachte in infizierten Mäusen eine schnell voranschreitende Influenza, die durch hohe Virustiter in der Lunge und der Trachea während der Akutphase der Erkrankung gekennzeichnet war (Abbildung 12). Bei der Sequenzierung des HA aus Lungen- und Tracheaprobe infizierter Mäuse, die am Tag 1 und 5 p. i. seziiert wurden, sowie des HA des

Ausgangsvirus Potsdam/15 und des im Tierversuch genutzten Virus mpPotsdam/15 konnten keine HA-222-Quasispezies detektiert werden. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass der HA-222D/G-Polymorphismus in H1N1-IAV eine biphasische Erkrankung auslösen kann. Eindeutige Aussagen dazu sind jedoch nur anhand des Vergleichs mpJena/5258- und HA-G222-mpJena/5258-infizierter Mäuse möglich. Da das Plaque-gereinigte Virus HA-G222-mpJena/5258 nur für antivirale Versuche genutzt wurde, dienen die Placebo-behandelten Tiere für den Vergleich. In beiden Experimenten verursachte HA-G222-mpJena/5258 einen kontinuierlichen Gewichtsverlust und eine allmähliche Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit einem Symptommöhepunkt zwischen Tag 5 und 7 p. i. (Abbildung 24 und 25). In der HA-Sequenz aus Lungen- und Tracheaprobe am Tag 4 p. i. sezierter Mäuse konnte kein Polymorphismus nachgewiesen werden. Damit wurde belegt, dass der HA-222D/G-Polymorphismus in mpJena/5258 tatsächlich für die Entstehung eines zweiten, späten Symptommöhepunktes im Mausmodell verantwortlich war.

Da die HA-222 ein Teil der Rezeptorbindestelle ist, wurden die HA-D222- und die HA-G222-Variante Plaque-gereinigt und der Einfluss des AS-Austauschs an dieser Position auf die Rezeptorbindung getestet. Dazu wurde die Replikation beider Varianten in MDCK- und MDBK-Zellen sowie die Hämagglutination von Hühner- und Schaferythrozyten bei 4 °C verglichen, die sich jeweils in der Expression der viralen Rezeptoren unterscheiden (Bauer et al. 2012, Medeiros et al. 2001). Laut den erhaltenen Ergebnissen banden beide Varianten stärker an SA α 2,6Gal als an SA α 2,3Gal. Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten zu den Rezeptorbindeeigenschaften von A(H1N1)pdm09-Viren überein. In einer Kohlenhydrat-Mikroarray-Untersuchung wurde gezeigt, dass diese Viren ein breites Spektrum α 2,3- und α 2,6-verknüpfter Sialinsäurerezeptoren erkennen, wobei die Bindeaffinität gegenüber α 2,6-verknüpften Sialinsäuren höher war als die gegenüber α 2,3-verknüpften Sialinsäuren (Childs et al. 2009). Weiterhin konnte für die HA-G222-Variante anhand einer besseren Replikation von HA-G222-mpJena/5258, verglichen mit HA-D222-mpJena/5258, auf MDBK-Zellen und der Hämagglutination von Schaferythrozyten eine verstärkte Bindung an SA α 2,3Gal nachgewiesen werden. Auch diese Ergebnisse entsprechen den Literaturdaten (Chutinimitkul et al. 2010, Liu et al. 2010, Takemae et al. 2010). Die Erweiterung der Rezeptorspezifität durch die HA-D222G konnte auch für das pandemische H1N1-Virus von 1918 gezeigt werden (Tumpey et al. 2007, Glaser et al. 2005, Stevens et al. 2006). Eine strukturelle Analyse der Rezeptorbindestelle des HA von einem A(H1N1)pdm09-Virus und einem pandemischen H1N1-Virus von 1918 ergab, dass es in beiden Viren durch die HA-D222G zu einem Verlust der Salzbrücke zwischen dem HA-D222 und dem HA-K219 kommt (Zhang et

al. 2013). Dadurch erlangt die 220-Helix eine höhere Flexibilität, die es dem darin enthaltenen HA-Q223 ermöglicht, mit dem aviären Rezeptor zu interagieren.

Die Unterschiede in der Rezeptorerkennung durch die HA-222D/G-Quasispezies sind im Mausmodell von großer Bedeutung, da die Rezeptorverteilung im Respirationstrakt dieser Tiere variiert. Anhand histochemischer Analysen mit Lektinen konnte gezeigt werden, dass Zilien-besetzte Epithelzellen der Trachea von BALB/c-Mäusen große Mengen SA α 2,3Gal und nur sehr schwach SA α 2,6Gal exprimieren (Bauer 2010, Ning et al. 2009). In der Lunge wurde auf Zilien-besetzten und -unbesetzten Epithelzellen der Bronchien und Bronchiolen gehäuft SA α 2,3Gal nachgewiesen, während SA α 2,6Gal vereinzelt auf beiden Zelltypen zu finden war. Die Lungenalveolen zeigten eine diffuse Verbreitung der SA α 2,3Gal, es wurden aber auch SA α 2,6Gal detektiert.

Die Verwendung des Lektin-basierten Rezeptornachweises ist umstritten, da Lektine nur an terminale Glykane, nicht aber an subterminale Strukturen binden, die durch das virale HA ebenfalls erkannt und unterschieden werden (Chandrasekaran et al. 2008, Srinivasan et al. 2008, Stevens et al. 2006). Zudem sind in kommerziell erhältlichen Testkits für den Rezeptornachweis (zum Beispiel von Roche) häufig beide Isoformen von MAA (MAA1 und 2) enthalten, die sich geringfügig in ihrer Spezifität unterscheiden (Nicholls et al. 2007). Da unabhängige Studien zur Rezeptorverteilung im Respirationstrakt von BALB/c-Mäusen gleiche Ergebnisse erzielten (Ning et al. 2009, Bauer 2010), die durch eine weitere Untersuchung in C57/BL6-Mäusen bestätigt wurden (van Riel et al. 2007), kann der Lektin-basierte Nachweis jedoch als Anhaltspunkt zur Rezeptorverteilung angesehen werden.

Diese Erkenntnisse helfen bei der Interpretation der organspezifischen Veränderung des Anteils der HA-D222- und HA-G222-Variante während der Replikation von mpJena/5258 in der Maus. Da in der Mastrachea hauptsächlich SA α 2,3Gal vorkommen, die von der HA-G222-Variante besser als von der HA-D222-Variante erkannt werden (Abbildung 15, Tabelle 12), hatte die HA-G222-Variante in diesem Organ einen Replikationsvorteil, der dazu führte, dass sie ab Tag 5 p. i. überwog (Abbildung 14). Dem Austausch der dominanten Virusvariante in der Trachea am Tag 5 p. i. folgte ein deutlicher Anstieg des Tracheatiters am Tag 6 p. i. (Abbildung 11C), der auf eine starke Replikation der HA-G222-Variante hindeutet. Im Gegensatz dazu blieb die HA-D222-Variante in der Lunge dominant (Abbildung 13), weil das alveoläre Parenchym neben SA α 2,3Gal auch SA α 2,6Gal exprimiert, die für die Replikation dieser Variante nötig sind.

Da die HA-222 auch ein Bestandteil der Antigenerkennungsstelle Ca2 ist, wurde die Reaktivität der nach der mpJena/5258-Infektion gebildeten Antikörper gegen HA-D222-

mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 getestet. Dabei wurde festgestellt, dass die Antikörper HA-D222-mpJena/5258 besser neutralisieren konnten als HA-G222-mpJena/5258 (Abbildung 16). Eine Studie zur Antikörpererkennung der Seren A(H1N1)pdm09-infizierter oder -geimpfter Personen konnte erst kürzlich zeigen, dass bereits kleine Veränderungen in den Antigenerkennungsstellen Unterschiede in der Kreuzreaktivität auslösen (Strengell et al. 2011). Um zu klären, ob die unterschiedliche Antikörpererkennung tatsächlich auf die HA-D222G oder auf den geringeren Anteil dieser Variante in den ersten Tagen der Infektion zurückzuführen war, ähnlich der schwächeren Induktion der Antikörperbildung nach einer Impfung mit einer niedrigen Antigendosis (Hauge et al. 2007), wurden Seren HA-G222-mpJena/5258-infizierter Mäuse untersucht. Dabei ließ sich die schlechtere Neutralisierbarkeit von HA-G222-mpJena/5258 bestätigen. Somit trug die verminderte Antikörpererkennung ebenfalls zur Selektion der HA-G222-Variante in der Trachea und der Zunahme ihres Anteils in der Lunge bei. Die Bildung der Antikörper führte in den mpJena/5258-infizierten Mäusen ab Tag 7 p. i. zur Titersenkung (Abbildung 11C), wobei diese in der Lunge, wo die besser neutralisierbare HA-D222-Variante dominierte, schneller verlief als in der Trachea, wo die HA-G222-Variante vorherrschte.

Die besondere Rolle von Quasispezies in der Virusevolution gilt als erwiesen (Domingo et al. 2012). So ermöglichen Quasispezies beispielsweise die Resistenzentstehung gegenüber antiviralen Medikamenten (Nguyen et al. 2012b) oder verstärken die Viruspathogenität (Ye et al. 2010). Anhand des HA-222D/G-Polymorphismus von mpJena/5258 wird deutlich, dass Quasispezies die Virusevolution innerhalb eines Wirtes beschleunigen können. Aufgrund der dualen Funktion der HA-222 als Teil der Rezeptorbindestelle und einer Antigenerkennungsstelle ermöglicht der HA-222D/G-Polymorphismus eine gleichzeitige Veränderung der Rezeptorspezifität sowie der Antikörpererkennung, was zu einer schnellen Anpassung des Virus an die Replikation im Respirationstrakt der Maus führt. Damit ist der HA-222D/G-Polymorphismus ein Beispiel dafür, wie Quasispezies die Anpassung eines IAV nach der Übertragung auf einen neuen Wirt unterstützen.

5.1.2 HA-G222 erhöht die Pathogenität von H1N1-IAV

Die Infektion von BALB/c-Mäusen mit dem A(H1N1)pdm09-Virus mpJena/5258 ergab eine in zwei Phasen verlaufende Erkrankung (Abbildung 11). Dabei war die zweite, spätere Krankheitsphase, die nach der Anreicherung der HA-G222-Variante in der Trachea auftrat, durch schwerere Symptome gekennzeichnet. Daraus leitete sich die Fragestellung ab, ob die HA-G222-Variante eine stärkere Pathogenität als die HA-D222-Variante in der Maus

induzierte. Diese Thematik wurde bereits von mehreren Studien untersucht, resultierte jedoch in widersprüchlichen Angaben (Abed et al. 2011b, Seyer et al. 2012, Xu et al. 2010, Zheng et al. 2010, Chutinimitkul et al. 2010). Darum sollten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen mit mpJena/5258 bzw. dem Plaque-gereinigten Isolat HA-G222-mpJena/5258 und mpPotsdam/15 helfen den Einfluss der HA-222 auf die Pathogenität im Mausmodell zu klären.

Das porcine Virus mpPotsdam/15 wurde für diese Untersuchungen ausgewählt, da es eine schwere Influenza in der Maus induzierte (Abbildung 12) und ein HA-G222 aufweist (Abbildung 7). Die zweite, ebenfalls für die Rezeptorbindung von H1N1-Viren maßgebliche AS (Stevens et al. 2006) ist wie in den übrigen untersuchten Viren ein HA-D187. Damit zeigt das Virus eine für porcine Viren typische AS-Kombination an diesen Positionen (Matrosovich et al. 2000). Die Testung der Rezeptorbindeeigenschaften anhand der Replikation auf MDCK- und MDBK-Zellen sowie der Hämagglutination von Hühner- und Schaferythrozyten ergab für mpPotsdam/15 eine starke Bindung an SA α 2,3Gal (Abbildung 10, Tabelle 8) und stimmt damit mit Literaturdaten zur Rezeptorspezifität anderer porcinen, *avian-like* H1N1-Viren überein (Matrosovich et al. 2000).

mpPotsdam/15 löste in BALB/c-Mäusen eine schwere, schnell voranschreitende Erkrankung aus. Eine im Vergleich zu mpJena/5258 10- bzw. 100-fach niedrigere Infektionsdosis von 10⁴ TCID₅₀ resultierte in einer hohen Letalität (Tabelle 20) sowie hohen Gewichtsverlusten und klinischen Scores (Abbildung 11, 12, 18, 19, 21 und 22). Gleichzeitig wurden signifikant höhere Virustiter in der Lunge und der Trachea mpPotsdam/15-infizierter Tiere festgestellt (Tabelle 20). Diese resultieren aus der starken Bindung des Virus an SA α 2,3Gal, die im Respirationstrakt der Mäuse stark exprimiert werden (Bauer 2010, Ning et al. 2009). Die verbesserte Replikation trägt somit zur starken Pathogenität von mpPotsdam/15 bei.

Ein weiterer Faktor, der die Pathogenität von mpPotsdam/15 begünstigt, ist die schlechte Erkennung durch neutralisierende Antikörper. So wiesen mpPotsdam/15-infizierte Mäuse deutlich geringere Titer spezifischer Antikörper auf als mpJena/5258-infizierte Tiere (Abbildung 16 und 17). Die Testung auf kreuzreaktive Antikörper konnte dabei ausschließen, dass eine verminderte Induktion der Antikörperbildung dafür ursächlich war. Dennoch waren die mpPotsdam/15-spezifischen Antikörper in der Lage, das Virus teilweise zu neutralisieren, denn mit dem Auftreten der ersten Antikörper am Tag 7 p. i. sanken die Virustiter in den überlebenden Mäusen ab (Abbildung 17). Der Todeszeitpunkt einiger Mäuse in den antiviralen Versuchen nach Tag 7 p. i., der aus einem weiteren Anstieg der Krankheitssymptome resultierte, deutet jedoch auf eine verlangsamte Viruseliminierung hin. Ein Großteil der

infizierten Mäuse entwickelte aber noch vor der Bildung erster Antikörper eine so schwere Erkrankung, dass sie aus tierschutzrechtlichen Gründen abgetötet werden mussten (Abbildung 21 und 22). Somit zeichnet sich die starke Pathogenität von mpPotsdam/15 auch durch das schnelle Voranschreiten der Erkrankung aus. Aufgrund der dualen Funktion der HA-222 als Determinante für die Rezeptorspezifität sowie Bestandteil einer Antigenerkennungsstelle ist ein Einfluss des HA-G222 auf die festgestellten Rezeptorbindeeigenschaften und die Antigenität und damit auf die Pathogenität von mpPotsdam/15 wahrscheinlich.

Ein Vergleich der HA-Sequenz von mpPotsdam/15 und mpJena/5258 (HA-D222-Variante; Abbildung 7) bzw. HA-G222-mpJena/5258 ergab eine Übereinstimmung von 82,7 bzw. 82,9 %. Während das HA von mpPotsdam/15 aviären Ursprungs ist (*avian-like*) und zwischen 1962 und 1974 in die Schweinepopulation eingetragen wurde (Krumbholz et al. 2014), stammt das HA des A(H1N1)pdm09-Virus mpJena/5258 von einem klassischen, porzinen H1N1-Virus (Garten et al. 2009), das durch den Eintrag eines aviären Virus in die Schweinepopulation um 1918 entstand (Brockwell-Staats et al. 2009). Die Unterschiede im HA der Viren begründen sich somit auf einer über viele Jahrzehnte getrennten Evolution. Aufgrund dieser genetischen Differenzen wird das HA von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 in verschiedene Linien des H1-Stammbaums eingruppiert (Zell et al. 2013).

Anhand des Sequenzvergleichs wird deutlich, dass sich die beiden Viren in vielen AS-Positionen unterscheiden (Abbildung 7). Besonders auffällig ist die Substitution an der HA-221 von Arginin (R) bei mpJena/5258 zu Lysin (K) bei mpPotsdam/15. Diese Position befindet sich direkt neben der HA-222 und liegt ebenfalls innerhalb der Rezeptorbindestelle und der Antigenerkennungsstelle Ca2. Bei der Herstellung von Maus-adaptierten A(H1N1)pdm09-Viren konnten Ilyushina et al. (2010) diese Mutation mit einer verbesserten Neutralisierbarkeit des Virus sowie einer reduzierten Bindung an SA α 2,6Gal, nicht aber einer veränderten Bindungsstärke gegenüber SA α 2,3Gal, in Zusammenhang bringen. Diese veränderten Eigenschaften treffen nur bedingt auf mpPotsdam/15 zu. Jedoch handelt es sich hierbei um ein prozines, *avian-like* H1N1-Virus, sodass sich die HA-R221K in diesem genetischen Hintergrund möglicherweise anders auswirkt. Weiterhin wurden im HA von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 Unterschiede an der HA-127 (HA-D127E) und der HA-183 (HA-S183P) festgestellt (Abbildung 7). Beide Mutationen wurden bei der Adaption eines A(H1N1)pdm09-Virus an die Maus beobachtet (Ye et al. 2010) und liegen außerhalb der Antigenerkennungsstellen und der Rezeptorbindestelle, jedoch in räumlicher Nähe dazu. Für die Einzelmutanten, noch deutlicher aber für die Doppelmutante, wurde eine Steigerung der Virulenz in der Maus festgestellt (Sakabe et al. 2011, Ye et al. 2010). Die HA-D127E

resultierte in einer schwächeren Erkennung durch Virus-spezifische, monoklonale Antikörper, beeinflusste aber nicht die Neutralisationstiter, die mit Seren von geimpften Personen ermittelt wurden (Schmeisser et al. 2013). Eine HA-D127E/HA-S183P-Doppelmutante war hingegen in der Lage die Neutralisationstiter von polyklonalen Frettchenseren zu reduzieren (Ye et al. 2010). Bei A(H1N1)pdm09-Viren, die nur die HA-D127E aufweisen, ist die Rezeptorspezifität nicht verändert (Chen et al. 2011). Die Kombination beider Substitutionen sorgt jedoch für eine erhöhte Bindung an SA α 2,3Gal, ohne die Bindestärke gegenüber SA α 2,6Gal zu verändern (O'Donnell et al. 2012). Diese Mutationen sind auch im HA des stark human- und mauspathogen H1N1-Virus der Pandemie von 1918 enthalten (Gamblin et al. 2004).

Diese Daten belegen, dass sich das HA von mpJena/5258 und von mpPotsdam/15 in mehreren Positionen unterscheidet, für die ein Einfluss auf die Pathogenität von H1N1-Viren gezeigt wurde. Dabei fällt auf, dass auch HA-Positionen außerhalb der Rezeptor- und der Antigenbindestellen die Rezeptorbindung und die Antigenität verändern können. Da die Pathogenität von IAV von multiplen Faktoren abhängt, können die übrigen Gensegmente von mpPotsdam/15 ebenfalls zur gesteigerten Pathogenität beitragen. So wird von mpPotsdam/15 beispielsweise ein komplettes PB1-F2 (90 AS umfassend) exprimiert, welches einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von IAV darstellt, während mpJena/5258 nur für eine verkürzte, 11 AS umfassende Variante kodiert (Krumbholz et al. 2011, Zell et al. 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Vergleich von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 nur bedingt geeignet ist, um Aussagen über den Einfluss der HA-222 auf die Pathogenität zu treffen.

Tabelle 20: Vergleich von Untersuchungsparametern mpJena/5258-, HA-G222-mpJena/5258- und mpPotsdam/15-infizierter Mäuse

	mpJena/5258 (10⁶ TCID₅₀)	HA-G222-mpJena/5258 (10⁶ TCID₅₀)	mpPotsdam/15 (10⁴ TCID₅₀)
Letalität	60 % ^a	80 % ^b	100 % ^c **g
Lungentiter (log ₁₀ TCID ₅₀ /g) am Tag 4 p. i.	6,00 ± 0,73 ^d	6,85 ± 0,28 ^e **g	7,41 ± 0,42 ^f ***g / * ^h
Tracheatiter (log ₁₀ TCID ₅₀ /g) am Tag 4 p. i.	3,21 ± 1,73 ^d	4,96 ± 0,53 ^e **g	6,16 ± 0,62 ^f ***g / * ^h

^a Die Letalität ist von zehn Placebo-behandelten, mpJena/5258-infizierten Mäusen (10⁶ TCID₅₀) eines antiviralen Versuchs, die über 21 Tage p. i. beobachtet wurden, angegeben (Abbildung 19A).

^b Die Letalität ist von 20 Placebo-behandelten, HA-G222-mpJena/5258-infizierten Mäusen (10⁶ TCID₅₀) zweier antiviraler Versuche, die über 21 Tage p. i. beobachtet wurden, angegeben (Abbildung 24A und 25A).

- ^c Die Letalität ist von 20 Placebo-behandelten, mpPotsdam/15-infizierten Mäusen (10^4 TCID₅₀) zweier antiviraler Versuche, die über 21 Tage p. i. beobachtet wurden, angegeben (Abbildung 21A und 22A).
- ^d Die Ergebnisse von fünf mpJena/5258-infizierten Mäusen (10^6 TCID₅₀), die zur Charakterisierung des Infektionsverlaufs dienten (Abbildung 11C) und von fünf Placebo-behandelten, mpJena/5258-infizierten Mäusen (10^6 TCID₅₀) eines antiviralen Versuchs, die alle am Tag 4 seziert wurden (Tabelle 13), sind zusammengefasst.
- ^e Die Ergebnisse von jeweils fünf Placebo-behandelten, HA-G222-mpJena/5258-infizierten Mäusen (10^6 TCID₅₀) zweier antiviraler Versuche, die am Tag 4 seziert wurden (Tabelle 18), sind zusammengefasst.
- ^f Die Ergebnisse von fünf mpPotsdam/15-infizierten Mäusen (10^4 TCID₅₀), die zur Charakterisierung des Infektionsverlaufs dienten (Abbildung 12C) und von jeweils fünf Placebo-behandelten, mpPotsdam/15-infizierten Mäusen (10^4 TCID₅₀) zweier antiviraler Versuche, die alle am Tag 4 seziert wurden (Tabelle 15), sind zusammengefasst.
- ^g Signifikanz gegenüber mpJena/5258
- ^h Signifikanz gegenüber HA-G222-mpJena/5258
- * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die Sequenzierung von mpJena/5258 und dem Plaque-gereinigtem Isolat HA-G222-mpJena/5258 ergab, dass sich beide Viren nur in der HA-222 sowie der HA-84 unterscheiden. Die beobachtete HA-S84I wurde bereits in anderen A(H1N1)pdm09-Isolaten gefunden (Falcone et al. 2013). Da diese AS-Position nicht zur Rezeptorbindestelle oder einer Antigenerkennungsstelle zählt, die Substitution kein Glykosylierungsmotiv einfügt oder zerstört und bisher in der Literatur nicht als Virulenz-verändernde AS beschrieben wurde, wird ein Einfluss auf die Pathogenität durch diese Substitution ausgeschlossen. Somit ist ein Vergleich des Infektionsverlaufs von mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 geeignet, um Aussagen über den Einfluss der HA-222 auf die Pathogenität in der Maus zu treffen.

Das A(H1N1)pdm09-Virus HA-G222-mpJena/5258 weist neben einem HA-G222 ein HA-D187 auf. In Übereinstimmung mit Literaturdaten (Chutinimitkul et al. 2010, Liu et al. 2010, Takemae et al. 2010) wurde neben einer starken Bindung an SA α 2,6Gal auch eine gegenüber mpJena/5258 verstärkte Erkennung von SA α 2,3Gal nachgewiesen (Abbildung 10 und 15, Tabelle 8 und 12).

Der Vergleich der Pathogenität von mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 ist anhand einer Gegenüberstellung der Ergebnisse der mpJena/5258-infizierten Mäuse, die bei der Charakterisierung des Infektionsverlaufs erhalten wurden (vgl. 4.2.1) und anhand der Daten

der Placebo-behandelten Mäuse der antiviralen Versuche mit mpJena/5258 (vgl. 4.3) und HA-G222-mpJena/5258 (vgl. 4.4.2), die jeweils mit 10^6 TCID₅₀ infiziert wurden, möglich. Es konnte keine signifikante Veränderung der Überlebensrate (Tabelle 20) und des maximalen Gewichtsverlusts (Abbildung 11A, 19B, 24B und 25B) festgestellt werden. Jedoch führte die HA-G222-mpJena/5258-Infektion zu einem erhöhten klinischen Score (Abbildung 11B, 19C, 24C und 25C) und signifikant höheren Lungen- und Tracheatitern (Tabelle 20). Diese sind auf eine verbesserte Erkennung der Rezeptoren im Respirationstrakt der Maus (überwiegend SA α 2,3Gal) zurückzuführen. Zusätzlich hatte ein HA-G222 eine schlechtere Erkennung durch neutralisierende Antikörper zur Folge (Abbildung 16). Somit sorgt ein HA-G222 bei A(H1N1)pdm09-Viren für eine Anpassung an die Replikation in der Maus. Dies zeigen auch zahlreiche Publikationen, bei denen die HA-D222G als Adaptionsmutation beschrieben wurde (Ilyushina et al. 2008, Sakabe et al. 2011, Seyer et al. 2012, Zheng et al. 2010).

Andere Studien beobachteten aber auch einen Einfluss der HA-D222G auf die Mortalitätsrate und die Körpergewichtsänderung (Abed et al. 2011b, Belser et al. 2011, Seyer et al. 2012, Xu et al. 2010, Zheng et al. 2010). Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass mpJena/5258 einen HA-222D/G-Polymorphismus aufwies, der dazu führte, dass die HA-D222-Variante in der Lunge und der Trachea infizierter Mäuse bis zum Tag 4 p. i. dominant war, bevor sich in der Trachea am Tag 5 p. i. die HA-G222-Variante durchsetzte (Abbildung 13 und 14). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Lungen- und Tracheatiter, zu deren Ermittlung die mpJena/5258-infizierten Mäuse am Tag 4 p. i. seziiert wurden, überwiegend von der HA-D222-Variante verursacht wurden. Die maximalen Körpergewichtsverluste wurden nach der Infektion mit mpJena/5258 während der zweiten Krankheitsphase am Tag 7 oder 8 p. i. und letale Infektionsverläufe erst ab Tag 5 p. i. beobachtet. Damit sind sie das Resultat der Überlagerung der von beiden Varianten ausgelösten Krankheitssymptome. Somit war es nicht möglich, für diese Parameter Unterschiede zwischen mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 festzustellen. Darum wäre die Untersuchung des Infektionsverlaufs des Plaquegereinigten Virus HA-D222-mpJena/5258 in der Maus hilfreich gewesen. Jedoch wurden mit diesem Isolat keine Tierversuche durchgeführt. Trotzdem lässt sich anhand der gewonnenen Ergebnisse unter Berücksichtigung des HA-222D/G-Polymorphismus von mpJena/5258 schlussfolgern, dass ein HA-G222 die Pathogenität von A(H1N1)pdm09-Viren in der Maus erhöht. Diese Beobachtung stimmt mit der Mehrzahl der bereits publizierten Daten überein (Abed et al. 2011b, Belser et al. 2011, Seyer et al. 2012, Xu et al. 2010, Zheng et al. 2010).

Einen weiteren Beleg für die gesteigerte Pathogenität von A(H1N1)pdm09-Viren mit einem HA-G222 lieferte die Zunahme der Mortalität nach einer Passage von Jena/5258 in der Maus.

Während die Jena/5258-Infektion in keiner untersuchten Maus letal verlief (Seidel 2011), wurde nach der mpJena/5258-Infektion eine Mortalitätsrate von 60 % festgestellt (jeweils 10^6 TCID₅₀; Abbildung 19A). Wie mittels der Sequenzierung von Lungenproben Jena/5258- und mpJena/5258-infizierter Mäuse gezeigt wurde, nahm der Anteil der HA-G222-Variante durch eine Lungenpassage des Virus zu (Abbildung 13 und Tabelle 11) und ist aufgrund der höheren Pathogenität dieser Variante für den letalen Verlauf in der späten Phase der mpJena/5258-Infektion verantwortlich. Durch die Sequenzierung aller Gensegmente von mpJena/5258 und mpJena/5258 konnten weitere Substitutionen als Ursache für den Anstieg der Pathogenität ausgeschlossen werden.

Aufgrund einer ähnlichen Rezeptorverteilung im Respirationstrakt von Frettchen und Menschen (van Riel et al. 2007) und vergleichbaren Krankheitssymptomen (Barnard 2009, Bouvier und Lowen 2010) lassen sich durch Experimente in diesen Tieren Rückschlüsse auf die Pathogenität und Übertragbarkeit von IAV im Menschen schließen. Die Untersuchung des Einflusses der HA-D222G in A(H1N1)pdm09-Viren auf die Pathogenität in Frettchen ergab jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Während Memoli et al. (2012) eine Verringerung der Krankheitssymptome durch die HA-D222G feststellten, konnte dies von zwei anderen Studien nicht bestätigt werden (Belser et al. 2011, Chutinimitkul et al. 2010). Alle Untersuchungen ergaben aber übereinstimmend keinen Einfluss der HA-D222G auf die ermittelten Virustiter. Eine Veränderung der Übertragbarkeit konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Belser et al. 2011, Memoli et al. 2012).

Neben einer Zunahme der Pathogenität in der Maus wurde auch eine Assoziation der HA-D222G mit schweren Verläufen von A(H1N1)pdm09-Infektionen im Mensch beobachtet. Zahlreiche Publikationen konnten zeigen, dass die HA-D222G hauptsächlich bei schwer oder fatal verlaufenden Erkrankungen detektiert wurde (Chen et al. 2010, Kilander et al. 2010, Mak et al. 2010, Melidou et al. 2014, Miller et al. 2010, Vazquez-Perez et al. 2013, Wedde et al. 2013, Chan et al. 2011). Bei diesen Untersuchungen traten neben der HA-D222G auch der HA-222D/G-Polymorphismus sowie viele weitere Polymorphismen mit bis zu fünf verschiedenen HA-222-Quasispezies (HA-222D/G/N/V/Y) in einem Patientenisolat auf (Wedde et al. 2013). Eine Detektion der HA-D222G in milden Fällen wurde nur selten beschrieben (Melidou et al. 2010, Wang et al. 2011). Weitere häufig festgestellte Mutationen waren die HA-D222E und die HA-D222N, die sowohl bei Patienten mit milden als auch schweren Krankheitsverläufen vorkamen (Chen et al. 2010, Kilander et al. 2010, Mak et al. 2010, Melidou et al. 2014, Miller et al. 2010, Vazquez-Perez et al. 2013, Wang et al. 2011, Wedde et al. 2013).

Als Ursache für den schweren Verlauf von Infektionen mit A(H1N1)pdm09-Viren, die die HA-D222G aufweisen, wird eine Korrelation der veränderten Rezeptorerkennung der Viren mit der Rezeptorverteilung im humanen Respirationstrakt angenommen (Chen et al. 2010, Vazquez-Perez et al. 2013, Wedde et al. 2013). Lektin-basierte Untersuchungen zeigten, dass die Epithelzellen der Nasennebenhöhlen, der Nasenschleimhaut, des Pharynx, der Trachea und der Bronchien überwiegend SA α 2,6Gal exprimieren, während in den Bronchiolen und in der Lunge eine Zunahme von SA α 2,3Gal erkennbar ist (Shinya et al. 2006, Ibricevic et al. 2006). Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass die verstärkte Erkennung von SA α 2,3Gal es Viren mit der HA-D222G ermöglicht, effizienter in der Lunge zu replizieren und damit schwere Erkrankungen wie Pneumonien hervorzurufen. In Übereinstimmung mit der humanen Rezeptorverteilung und den Rezeptorbindeeigenschaften von A(H1N1)pdm09-Viren fanden Chen et al. (2010) und Chan et al. (2011) die HA-G222-Variante häufiger in Patientenproben aus dem unteren als aus dem oberen Respirationstrakt derselben Personen. Auch Wedde et al. (2013) beschreiben einen höheren Anteil der HA-G222-Variante in der Lunge im Vergleich zu einem Nasenabstich eines Patienten nach der Infektion mit einem Virus mit einem HA-222D/G-Polymorphismus. Daneben konnten sie die Entstehung und anschließende Zunahme der HA-G222-Variante im unteren Respirationstrakt eines immunsupprimierten Patienten mit schwerer Influenza über mehrere Wochen nachverfolgen (Wedde et al. 2013). Daraus ergeben sich Parallelen zu den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen nach der Infektion von Mäusen mit mpJena/5258. In den infizierten Tieren wurde ebenfalls eine Zunahme der HA-G222-Variante festgestellt. Aufgrund der abweichenden Rezeptorverteilung reicherten sich die HA-G222-Varianten jedoch in der Mastrachea und nicht in der Lunge an.

Detaillierte Untersuchungen der Rezeptorexpression in den menschlichen Atemwegen ergaben, dass SA α 2,3Gal nur von Zilien-besetzten tracheobronchialen Epithelzellen (Ibricevic et al. 2006) und Typ II-Pneumozyten der Lunge (Shinya et al. 2006) exprimiert werden. Deren Schädigung beeinträchtigt den mukoziliären Transport und trägt so ebenfalls zur Schwere der Krankheit bei. Das dies bei A(H1N1)pdm09-Viren mit einem HA-G222 der Fall ist, konnte durch eine Studie von Liu et al. (2010) bestätigt werden. Sie zeigt, dass Viren mit einem HA-G222 Zilien-besetzte und -unbesetzte Zellen einer humanen, tracheobronchialen Epithelzelllinie infizieren, während Viren mit einem HA-D222 überwiegend Zilien-unbesetzte Zellen infizieren und damit den mukoziliären Transport nicht behindern.

Anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten konnte bestätigt werden, dass H1N1-Viren mit einem HA-G222 in der Maus zu einer gesteigerten Pathogenität führen. Der HA-222D/G-

Polymorphismus, der in mpJena/5258 gefunden wurde, erschwerte jedoch den Vergleich mit dem Plaque-gereinigten Isolat HA-G222-mpJena/5258. Die schweren und letal verlaufenden Erkrankungen, die nach der Infektion in Mäusen mit mpPotsdam/15, welches ebenfalls ein HA-G222 enthält, beobachtet wurden, stützen diese Schlussfolgerung. Jedoch wird die Pathogenität von mpPotsdam/15 auch von weiteren Faktoren beeinflusst.

Obwohl der HA-222D/G-Polymorphismus in zahlreichen humanen Isolaten gefunden wurde (Chen et al. 2009, Kilander et al. 2010, Mak et al. 2010, Miller et al. 2010, Vazquez-Perez et al. 2013, Wang et al. 2011, Wedde et al. 2013) und ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Quasispezies und der beobachteten Pathogenität angenommen wird (Resende et al. 2014), wurden dazu bisher keine Modellversuche durchgeführt. Anhand der Infektion von BALB/c-Mäusen mit mpJena/5258 konnte eine zeitliche Korrelation der Zunahme des Anteils der HA-G222-Spezies, des Titeranstiegs und der Verschlechterung der Krankheitssymptome gezeigt werden. Damit wurde erstmals in einem Mausmodell die Bedeutung des HA-222D/G-Polymorphismus für die Pathogenität nachgewiesen.

5.2 Der Einfluss der HA-222 auf die Wirkung von Oseltamivir

Mutationen im HA von IAV sind bereits länger als Ursache für das Auftreten von NAI-Resistenzen in Zellkultursystemen bekannt (Blick et al. 1998, McKimm-Breschkin et al. 1996, McKimm-Breschkin et al. 2012). Die funktionelle NA-HA-Balance, die für eine effektive Replikation in der Zellkultur und *in vivo* erforderlich ist (Gerlach et al. 2012), spielt dabei eine zentrale Rolle. Durch die Zugabe von NAI wird die Aktivität der viralen NA gehemmt, wodurch die NA-HA-Balance gestört wird und es zu einer verminderten Replikationsrate kommt. Mutationen im HA, die die Affinität zu den Rezeptoren herabsetzen, sorgen für eine geringere Abhängigkeit des Virus von der NA-Aktivität und können so das funktionelle Gleichgewicht wieder herstellen (Wagner et al. 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der HA-222 auf die Wirkung von NAI untersucht. In *In vitro*- und *In vivo*-Experimenten erfolgte die Testung der Oseltamivir-Empfindlichkeit von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 sowie des Plaque-gereinigten Isolats HA-G222-mpJena/5258. Das Nukleosidanalogen Ribavirin wurde ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen, da für diese Substanz eine Wirkung gegen IAV in der Zellkultur und im Mausmodell beschrieben wurde (Sidwell et al. 1972) und es aufgrund seines Wirkmechanismus von der NA-HA-Balance unabhängig ist.

Da die NA der A(H1N1)pdm09-Viren von einem porzinen, *avian-like* H1N1-Virus stammt (Garten et al. 2009), zu denen auch mpPotsdam/15 zählt, weisen die NA-Sequenzen von

mpJena/5258 bzw. HA-G222-mpJena/5258, dessen NA-Sequenz mit der von mpJena/5258 identisch ist, und mpPotsdam/15 eine hohe Identität auf (91,7 %; Abbildung 8). Frühere Untersuchungen in einem NA-Hemmtest mit mpJena/5258 und mpPotsdam/15 ergaben eine hohe Sensitivität gegenüber den NAI Oseltamivir und Zanamivir (vgl. 2.4) (Seidel 2011, Topf 2010). Mithilfe eines zpE-Hemmtests auf MDCK-Zellen konnte die gute Empfindlichkeit dieser Viren sowie von HA-G222-mpJena/5258 bestätigt werden (Tabelle 9 und 17), jedoch lagen die ermittelten IC_{50} -Werte über denen des NA-Hemmtests (Seidel 2011, Topf 2010). Dies wurde bereits für andere IAV beobachtet (Grienke et al. 2014), denn während im NA-Hemmtest lediglich die Wirkung auf das Enzym ermittelt wird, zeigt der zpE-Hemmtest die Substanzwirkung auf die vollständige Virusreplikation. Zudem ergab der zpE-Hemmtest für die porzinen H1N1-Isolate niedrigere IC_{50} -Werte gegenüber den getesteten NAI als für die A(H1N1)pdm09-Isolate. Leichte Schwankungen in der Wirkung gegen unterschiedliche Viren wurden ebenfalls durch andere Autoren beschrieben (Sidwell et al. 2005, Grienke et al. 2014, Sidwell et al. 1998). Die Ermittlung der Empfindlichkeit für die Ausgangsviren und die einmalig Maus- und MDCK-Zell-passagierten Viren führte zu vergleichbaren Ergebnissen, sodass eine Änderung der Substanzwirkung durch die Passagierung ausgeschlossen wurde. Die phänotypischen Ergebnisse stimmten mit den genotypischen Daten überein, da in den NA-Sequenzen keine der bisher bekannten NAI-Resistenzmutationen (Nguyen et al. 2012a) gefunden wurden.

McKimm-Breschkin et al. (2013) konnten erst kürzlich zeigen, dass die HA-D222G bei einem saisonalen H1N1-Virus in Zell-basierten Tests im Zusammenhang mit der Empfindlichkeit gegenüber NAI steht. Sowohl in MDCK-Zellen als auch in SIAT-MDCK-Zellen, welche, verglichen mit MDCK-Zellen, einen erhöhten Anteil an SA α 2,6Gal exprimieren, wurde eine reduzierte NAI-Empfindlichkeit nachgewiesen. Eine andere Publikation demonstrierte, dass der HA-222D/G-Polymorphismus in A(H1N1)pdm09-Viren zu einer verringerten Sensitivität gegenüber Zanamivir auf MDCK-Zellen führte (Triana-Baltzer et al. 2009). Damit stehen beide Studien im Widerspruch zu den in dieser Arbeit beschriebenen Daten, denn alle untersuchten Viren waren unabhängig von der HA-222 im zpE-Hemmtest auf MDCK-Zellen sehr empfindlich gegenüber Oseltamivir und Zanamivir (Tabelle 9 und 17). Möglicherweise wirkt sich die HA-D222G jedoch in saisonalen H1N1-Viren anders auf die NA-HA-Balance aus als in porzinen, *avian-like* H1N1- und A(H1N1)pdm09-Viren, da sich der genetische Hintergrund der Viren unterscheidet. Zudem wiesen alle in der Studie von Triana-Baltzer et al. (2009) untersuchten A(H1N1)pdm09-Viren die Oseltamivir-Resistenzmutation NA-

H275Y auf, die zu einer Verringerung der NA-Aktivität führt (Abed et al. 2004) und so ebenfalls das funktionelle Gleichgewicht von HA und NA verändern kann.

Anhand einer früheren Arbeit war bereits bekannt, dass die *in vitro* gefundene Oseltamivir-Sensitivität von mpJena/5258 nicht mit den *In vivo*-Daten übereinstimmt (vgl. 2.4) (Seidel 2011). Eine Oseltamivir-Behandlung mit 10 mg/kg/d über fünf Tage (Behandlungsbeginn vier Stunden vor Infektion, zweimal täglich verabreicht) zeigte bei BALB/c-Mäusen, die mit 10^6 TCID₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden, keinen Wirkeffekt. Diese Behandlung resultiert in einer ähnlichen Bioverfügbarkeit der Wirksubstanz in der Maus wie die Verabreichung von 75 mg Oseltamivir (zweimal täglich) im Mensch (Ward et al. 2005), der von der WHO empfohlenen Medikation (WHO 2010). Da die Tiere eine schwere Erkrankung aufwiesen, die von starken Krankheitssymptomen mit teilweise fatalem Verlauf gekennzeichnet war, bestand die Möglichkeit, dass die verwendete Infektionsdosis zu hoch war, um eine Wirkung von Oseltamivir zu beobachten. Aus diesem Grund wurde ein vergleichbarer Versuch mit einer 10-fach niedrigeren Infektionsdosis (10^5 TCID₅₀) durchgeführt. Doch auch hierbei zeigte die Behandlung mit 10 mg/kg/d Oseltamivir keine Wirkung auf die untersuchten Parameter (Tabelle 14).

Da anhand der Charakterisierung des Infektionsverlaufs von mpJena/5258 bekannt war, dass das Virus am Tag 6 p. i. ein zweites Titermaximum aufwies, wurde in einem weiteren Versuch getestet, ob die zuvor verwendete Oseltamivir-Konzentration zu niedrig und der Behandlungszeitraum zu kurz war. Denn auch bei schweren A(H1N1)pdm09-Infektionen im Mensch wurde von der WHO die Empfehlung zu einer verlängerten Behandlung (länger als fünf Tage) und einer höheren Dosierung (zweimal täglich 150 mg anstatt zweimal täglich 75 mg) gegeben (WHO 2010). Weil ausgeschlossen wurde, dass die hohe Infektionsdosis für die Nichtwirkung von 10 mg/kg/d Oseltamivir (über fünf Tage verabreicht) verantwortlich war, erfolgte der Versuch mit einer Infektionsdosis von 10^6 TCID₅₀ mpJena/5258. Die Behandlung über fünf oder sieben Tage mit 100 mg/kg/d Oseltamivir (Beginn jeweils vier Stunden vor Infektion) hatte jedoch ebenfalls keine signifikante Wirkung auf die Untersuchungsparameter (Tabelle 14). In der Literatur gibt es nur wenige Daten über die Oseltamivir-Behandlung von Infektionen mit nicht adaptierten A(H1N1)pdm09-Viren in der Maus. Zwei Studien, bei denen BALB/c-Mäuse mit 80 mg/kg/d Oseltamivir über fünf Tage behandelt wurden, zeigten teilweise eine signifikante Wirkung auf den Lungentiter am Tag 3 und 6 p. i. (Itoh et al. 2009, Kiso et al. 2010). Jedoch wurden in den Publikationen keine weiteren Untersuchungsparameter untersucht, sodass die Wirkung nicht eindeutig belegt ist.

Aufgrund seiner guten Wirkung gegenüber IAV in der Maus wurde das Nukleosidanalogen Ribavirin als Kontrollsubstanz für die antiviralen Versuche eingesetzt (Ilyushina et al. 2008, Julander et al. 2011, Smee et al. 2012, Sidwell et al. 1972). Eine Behandlung mpJena/5258-infizierter Mäuse (10^6 TCID₅₀) mit 100 mg/kg/d Ribavirin (Beginn vier Stunden vor Infektion) über fünf Tage hatte eine signifikante Verbesserung des Überlebens, der Gewichtsänderung, des klinischen Scores, der mittleren Überlebenszeit und des Lungentiters am Tag 4 p. i. zur Folge (Tabelle 14). Somit konnte gezeigt werden, dass trotz der hohen Infektionsdosis eine erfolgreiche antivirale Behandlung der mpJena/5258-Infektion möglich ist. Die eingesetzte Ribavirin-Konzentration (100 mg/kg/d) lag unterhalb der 50%igen letalen Dosis von 220 mg/kg/d (zweimal täglich, über fünf Tage verabreicht) in BALB/c-Mäusen (Sidwell et al. 2005). In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten beobachteten auch Rowe et al. (2010) in Mäusen, die mit einem nicht adaptierten A(H1N1)pdm09-Virus infiziert und mit 40 mg/kg/d Ribavirin über sieben Tage behandelt wurden, eine deutliche Steigerung der Überlebensrate und eine Senkung des Lungentiters am Tag 3 p. i. Zudem wiesen sie nach, dass eine Verzögerung des Behandlungsbeginns sowie niedrigere Ribavirin-Konzentrationen keine Wirkung auf das Überleben hatten, während für den Lungentiter eine Dosisabhängigkeit und eine Abhängigkeit vom Behandlungsbeginn gezeigt wurden.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Wirksamkeit von Oseltamivir und Ribavirin gegen mpJena/5258 stellt der jeweilige Wirkmechanismus dar. Oseltamivir beeinträchtigt die Virusausbreitung durch die Hemmung der NA (Kim et al. 1998). Im Gegensatz dazu beruht die Wirkung von Ribavirin, welches ein synthetisches Nukleosidanalogen ist und 1972 erstmals hergestellt wurde (Witkowski et al. 1972), auf einer Vielzahl von direkten und indirekten Mechanismen, deren Effekt zwischen unterschiedlichen Viren variieren kann (Graci und Cameron 2006) und die noch immer nicht vollständig verstanden sind. Als direkte Wirkmechanismen werden die kompetitive Hemmung der viralen RNA-Polymerase durch Ribavirintriphosphat, das primäre intrazelluläre Metabolit von Ribavirin, das Verhindern der Nutzung der Cap-Struktur als Transkriptionsstart und eine Erhöhung der Mutationsfrequenz durch den Einbau von Ribavirin in die virale RNA diskutiert. Bei den indirekten Mechanismen handelt es sich um die Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) in der Wirtszelle, die eine Senkung der Guanosintriphosphat (GTP)-Konzentration und somit eine Limitierung der Replikation zur Folge hat, sowie die Modulation der Immunantwort des Wirts. Die Wirkung auf IAV scheint hauptsächlich durch den langsamen Einbau von Ribavirin in die virale RNA vermittelt zu sein, der zu einer letalen Mutagenese, also einem Anstieg der Mutationsfrequenz und einem damit verbundenen Untergang der

Viruspopulation führt, da die hohe Fehlerrate im Genom nicht mehr ausgeglichen werden kann (Parker 2005). Dieser Prozess wird auch als „Errorkatastrophe“ bezeichnet (Crotty und Andino 2002). Einen Hinweis auf diese Art der Wirkung von Ribavirin im Tierversuch mit mpJena/5258 stellen die erst nach Ende der Substanzgabe sichtbaren Effekte auf den klinischen Score (ab Tag 5 p. i.) und die Gewichtsänderung (ab Tag 6 p. i.) dar (Abbildung 19B und C), denn für die letale Mutagenese ist der Einbau von Ribavirin über eine Vielzahl an Replikationszyklen nötig (Parker 2005). Eine Wirkung auf den Virustiter in der Lunge konnte bereits am Tag 4 p. i. festgestellt werden (Tabelle 13).

Auch in den antiviralen Tierversuchen mit mpJena/5258 konnte teilweise eine in zwei Phasen verlaufende Erkrankung beobachtet werden. Dies zeigte sich besonders deutlich in den Oseltamivir-behandelten Versuchsgruppen (Abbildung 18 und 19). Da die Charakterisierung des Infektionsverlaufs ergab, dass mpJena/5258 bis zum Tag 6 p. i. mit hohen Virustitern in der Lunge und der Trachea replizierte (Abbildung 11C), bestand die Möglichkeit, dass der biphasische Krankheitsverlauf in Mäusen, die nur bis zum Tag 4 p. i. behandelt wurden, durch eine erneute Replikation der nach Behandlungsende verbleibenden Viren entstand. Darum wurde die Oseltamivir-Gabe bis zum Tag 6 p. i. verlängert, da an diesem Tag in den vorangegangenen Untersuchungen die ersten neutralisierenden Antikörper messbar waren, die schließlich zur Senkung des Virustiters führten. Die Verabreichung von Oseltamivir bis zum Tag 6 p. i. resultierte jedoch auch in einem biphasischen Erkrankungsverlauf. Dabei setzte die zweite Phase der Symptomzunahme noch während der Substanzbehandlung ein. Somit scheint die Therapie mit 100 mg/kg/d Oseltamivir auch bei einer verlängerten Gabe die organspezifischen Veränderungen an der HA-222 nicht verhindern zu können. Eine Minderung der Krankheitssymptome war in den Oseltamivir-behandelten Gruppen ähnlich wie in den Placebo-Mäusen erst nach der Bildung erster spezifischer Antikörper (Abbildung 16) sichtbar. Im Gegensatz dazu unterband die Ribavirin-Behandlung die zweite Erkrankungsphase (Abbildung 19). Daraus kann geschlossen werden, dass Ribavirin gegen beide HA-222-Quasispezies wirkte.

Um zu klären, ob die HA-222 im Zusammenhang mit der Oseltamivir-Empfindlichkeit in der Maus steht, wurden antivirale Versuche mit dem Plaque-gereinigten Isolat HA-G222-mpJena/5258 durchgeführt. Die Behandlung HA-G222-mpJena/5258-infizierter Mäuse mit 10 mg/kg/d Oseltamivir über fünf Tage (Beginn vier Stunden vor Infektion) resultierte in einer signifikanten Steigerung der Überlebensrate sowie einer signifikanten Senkung des klinischen Scores und beeinflusste das Körpergewicht in der Anfangsphase der Erkrankung (nicht signifikant; Abbildung 24) sowie die mittlere Überlebenszeit positiv (nicht signifikant;

Tabelle 19). Anhand dieses Versuchs wurde deutlich, dass die Veränderung in der HA-222 zu einer teilweisen Behandelbarkeit der IAV-Infektion mit 10 mg/kg/d Oseltamivir in BALB/c-Mäusen führte. Besonders hervorzuheben ist die Wirkung auf die Mortalität, die das strengste Kriterium für eine Substanzwirkung darstellt.

Parallel dazu wurden antivirale Tierversuche mit dem porzinen H1N1-Isolat mpPotsdam/15 durchgeführt, welches ebenfalls ein HA-G222 aufweist und eine schnell voranschreitende, sehr schwerem Erkrankung in den Mäusen auslöste. Eine Behandlung mit 10 mg/kg/d Oseltamivir über fünf Tage (Beginn vier Stunden vor Infektion) senkte das Lungengewicht am Tag 4 p. i. signifikant und verbesserte den klinischen Score sowie den histopathologischen Score am Tag 4 p. i. leicht (nicht signifikant, Tabelle 16). Die Verabreichung von 100 mg/kg/d über fünf Tage (Beginn vier Stunden vor Infektion) resultierte in einem signifikanten Effekt auf die Mehrzahl der untersuchten Parameter (Tabelle 16). Auch bei mpPotsdam/15-infizierten Mäusen wurde wie bei mpJena/5258-infizierten Tieren eine Verschlechterung der Krankheitssymptome nach Absetzen der Oseltamivir-Behandlung beobachtet (Abbildung 21). Somit scheint die zweite Erkrankungsphase bei mpJena/5258-infizierten, Oseltamivir-behandelten Mäusen nicht allein auf den HA-222D/G-Polymorphismus zurückzuführen zu sein.

Aufgrund der Ergebnisse aus dem ersten antiviralen *In vivo*-Experiment mit mpPotsdam/15 erfolgte ein weiterer Versuch mit einer verlängerten Behandlungsdauer bis zum Tag 6 p. i., um zu untersuchen, ob sich dadurch der therapeutische Erfolg weiter verbessern und die Verschlechterung der Krankheitssymptome nach Absetzen der Oseltamivir-Behandlung verhindern lassen. Weil die Oseltamivir-Konzentration von 100 mg/kg/d, über fünf Tage verabreicht, bereits eine Wirkung auf viele Untersuchungsparameter zeigte, wurde zusätzlich eine verzögerte Behandlung ausgetestet, die am Tag 2 p. i. startete, wenn bereits erste Krankheitssymptome feststellbar sind (Abbildung 21 und 22). Die Verabreichung von 100 mg/kg/d Oseltamivir vom Tag 0 bis 6 p. i. und vom Tag 2 bis 6 p. i. wirkten sich signifikant auf die Überlebensrate, das Körpergewicht, den klinischen Score und die mittlere Überlebenszeit aus (Tabelle 16). Die Behandlung ab Tag 2 p. i. konnte zusätzlich den Lungentiter am Tag 4 p. i. signifikant senken. Somit wird deutlich, dass 100 mg/kg/d Oseltamivir prophylaktisch (ab Tag 0 p. i.) und therapeutisch (ab Tag 2 p. i.) verabreicht, eine ähnliche Wirkung in mpPotsdam/15-infizierten Mäusen hervorruft. Die verlängerte Oseltamivir-Gabe verhinderte aber auch in diesem Modell nicht die Symptomzunahme während der Behandlung. Die Wirkung von Oseltamivir beruht auf einer Abschwächung des schnell voranschreitenden Krankheitsverlaufs in der frühen Infektionsphase (bis Tag 5 p. i.).

Infolge dieser Ergebnisse wurde die therapeutische Gabe von 100 mg/kg/d Oseltamivir auch in HA-G222-mpJena/5258-infizierten Tieren untersucht. Die Behandlung von Tag 2 bis 6 p. i. senkte den Lungentiter am Tag 4 p. i. signifikant und hatte eine leichte Wirkung auf den klinischen Score (nicht signifikant, Tabelle 19). Damit war der therapeutische Effekt deutlich schwächer als zuvor bei mpPotsdam/15-infizierten Mäusen beobachtet, aber trotzdem war im Vergleich zu mpJena/5258-infizierten Tieren eine Wirkung nachweisbar. Da sich die Viren mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 nur in der HA-84, die für die Rezeptorbindung nicht von Bedeutung ist und der HA-222 unterscheiden, ist ein Zusammenhang der Oseltamivir-Empfindlichkeit mit der HA-222 naheliegend. Diese Unterschiede scheinen ebenfalls auf eine Veränderung der NA-HA-Balance zurückzuführen zu sein. Das Virus mpJena/5258, dessen HA-222D-Variante in der Lunge und in den ersten Tagen auch in der Trachea bei infizierten Mäusen dominant war, hat nur eine sehr geringe Affinität zu SA α 2,3Gal, den überwiegenden Influenzarezeptoren im Respirationstrakt von Mäusen (Bauer et al. 2012, Ning et al. 2009). Aus diesem Grund ist das Virus für die Replikation nicht auf eine hohe NA-Aktivität angewiesen und kann sich trotz der Hemmung der NA durch Oseltamivir weiter vermehren. Die effiziente Replikation von HA-G222-mpJena/5258, das eine höhere Affinität zu SA α 2,3Gal besitzt, ist dagegen stärker von der Aktivität der NA abhängig. Wird diese durch Oseltamivir inhibiert, erfolgt die Virusvermehrung nur noch eingeschränkt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse, die mit mpPotsdam/15 erzielt wurden. Dieses Virus weist ebenfalls ein HA-G222 auf und zeigte von allen untersuchten Viren die stärkste Bindeaffinität zu SA α 2,3Gal (Abbildung 10, Tabelle 8). Deshalb ist mpPotsdam/15 bei der Replikation stark von der NA-Aktivität abhängig, was im Umkehrschluss bedeutet, dass die Vermehrung dieses Virus in der Maus am besten durch NAI gehemmt werden sollte. Tatsächlich wurde die stärkste *In vivo*-Wirkung von Oseltamivir in dieser Arbeit auf das Isolat mpPotsdam/15 nachgewiesen.

Die in früheren Arbeiten (Seidel 2011, Topf 2010) und in dieser Arbeit durchgeführten Enzym-basierten Tests, die unabhängig vom HA der Viren sind und eine NAI-Sensitivität der NA von mpJena/5258, mpPotsdam/15 und HA-G222-mpJena/5258 zeigten, lassen darauf schließen, dass die Veränderung der NA-HA-Balance tatsächlich für die unterschiedliche Oseltamivir-Wirkung der HA-222-Varianten in der Maus verantwortlich ist. Auf MDCK-Zellen konnte ebenfalls kein Einfluss der HA-222 in Verbindung mit einer Veränderung des funktionellen Gleichgewichts von NA und HA auf die NAI-Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Jedoch ergab der Vergleich der Hämagglutinationstiter bei 4 und 37 °C einen Effekt der HA-222 auf die NA-HA-Balance, da mpJena/5258, nicht aber HA-G222-mpJena/5258

und mpPotsdam/15, eine durch die NA-Aktivität ausgelöste Elution von den Hühnererythrozyten zeigte (Tabelle 8 und 12). Im Gegensatz dazu eluierte HA-G222-mpJena/5258 von den Schaferythrozyten, während mpPotsdam/15 nur eine sehr schwache Elution hervorrief und mpJena/5258 nicht an diese band. Auch die unterschiedliche Replikation der Viren auf MDCK- und MDBK-Zellen (Abbildung 10 und 15) deutet auf eine veränderte NA-HA-Balance hin. Somit korrelieren die *In vitro*- und *In vivo*-Ergebnisse schlecht miteinander und machen Voraussagen für die Situation im Mensch nicht möglich.

Anhand der hier durchgeführten Experimente konnte erstmals der Einfluss der HA-222 auf die NAI-Empfindlichkeit in der Maus demonstriert werden. Die Bedeutung der NA-HA-Balance für die Pathogenität und Übertragbarkeit von IAV wird bereits seit längerem diskutiert. So konnten Gen et al. (2013) zeigen, dass die Störung der Balance durch die Mutation HA-E190K zur Attenuierung des H1N1-Virus A/WSN/33 in der Maus führt. Zudem scheint das funktionelle Gleichgewicht eine Voraussetzung für die Übertragung von A(H1N1)pdm09-Viren zu sein, da porcine Vorläuferviren, die diese Balance nicht aufwiesen, nur eingeschränkt in Frettchen übertragbar sind (Xu et al. 2012). Mutationen in der NA und/oder im HA verbessern nach einem Wirtswechsel die funktionelle Balance zwischen diesen beiden Proteinen, um die Replikation im neuen Wirt zu verbessern (Wagner et al. 2002). In Übereinstimmung damit wurde die HA-D222G mehrfach als eine Adaption von A(H1N1)pdm09-Viren an die Replikation in der Maus beschrieben (Ilyushina et al. 2008, Sakabe et al. 2011, Seyer et al. 2012, Zheng et al. 2010), die zu einer Steigerung der Pathogenität führte, was auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (vgl. 5.1.2).

Andere Studien beschäftigten sich ebenfalls mit der Oseltamivir-Empfindlichkeit von A(H1N1)pdm09-Viren in der Maus. Interessanterweise wurden fast alle Untersuchungen mit dem über neun Lungenpassagen an die Maus adaptierten Virus A/California/04/09 durchgeführt (Bantia et al. 2011, Julander et al. 2011, Nguyen et al. 2012c, Zarogiannis et al. 2012), welches ebenfalls die HA-D222G aufweist (Ilyushina et al. 2008). Bereits die prophylaktische Verabreichung (Beginn vier Stunden vor Infektion) von 10 mg/kg/d Oseltamivir über fünf Tage hatte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben, das Körpergewicht, das Lungengewicht und den Lungenscore (Julander et al. 2011). Höhere Oseltamivir-Konzentrationen (50 und 100 mg/kg/d) waren in der Lage die Wirkung weiter zu steigern (Zarogiannis et al. 2012, Julander et al. 2011). Selbst eine therapeutische Oseltamivir-Behandlung (ab 24 Stunden nach Infektion) über fünf Tage mit 20 oder 25 mg/kg/d sorgte für einen signifikanten Effekt auf das Überleben (Bantia et al. 2011, Nguyen et al. 2012c). Somit scheint die Anpassung des Virus an die Maus die Wirkung des NAI

Oseltamivir zu verbessern. Dies konnte auch in dieser Arbeit anhand der besseren Behandelbarkeit der HA-G222-mpJena/5258- gegenüber der mpJena/5258-Infektion gezeigt werden. Die noch deutlicher ausgeprägte Oseltamivir-Wirkung in den Publikationen beruht wahrscheinlich auf weiteren Adaptionismutationen von A/California/04/09 im HA (HA-G155E, HA-S183P) (Ilyushina et al. 2008).

In der Vergangenheit wurden vereinzelt immer wieder Fälle der Ansteckung von Menschen mit porzinen Viren berichtet, jedoch konnten sich diese Viren nicht in der humanen Population verbreiten (Myers et al. 2007). Aus diesem Grund spielte die Empfindlichkeitstestung dieser Viren gegenüber zugelassenen Anti-Influenza-Medikamenten nur eine untergeordnete Rolle. Mit Auftreten der A(H1N1)pdm09-Viren, deren Ursprung porzine Viren sind (Garten et al. 2009), ist die Bedeutung der Überwachung der Empfindlichkeit dieser Viren stärker in den Vordergrund gerückt. Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische Gabe von 10 mg/kg/d Oseltamivir eine signifikante Wirkung auf das Überleben, die Körpergewichtsänderung und den klinischen Score mpPotsdam/15-infizierter BALB/c-Mäuse hatte (Topf 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde für diese Oseltamivir-Konzentration lediglich eine signifikante Wirkung auf das Lungengewicht am Tag 4 p. i. nachgewiesen (Tabelle 15). Die Behandlung mit 100 mg/kg/d Oseltamivir resultierte jedoch in einer Wirkung auf alle zuvor genannten Parameter und konnte so die Oseltamivir-Empfindlichkeit des Virus im Mausmodell bestätigen. Die Dissertation von Bauer (2010) beschreibt zwei Varianten des porzinen, *avian-like* H1N1-Isolats A/swine/Belzig/2/01, die sich aufgrund einer unterschiedlichen Passagenhistorie in der HA-135 und der HA-222 unterscheiden. Während eine Variante, welche ein HA-A135 und ein HA-E222 aufwies, in einem Zell-basierten Test NAI resistent und in der Maus nur mäßig mit 10 mg/kg/d Oseltamivir behandelbar war, erwies sich die zweite Variante mit einem HA-138A/S- und einem HA-222E/G-Polymorphismus im Zell-basierten Test und in der Maus als Oseltamivir-empfindlich. Auch in diesem Fall könnte eine Veränderung der NA-HA-Balance für die unterschiedliche Oseltamivir-Empfindlichkeit verantwortlich sein. Weitere Studien zur Effektivität der antiviralen Behandlung porziner H1N1-Viren mit NAI im Mausmodell sind derzeit nicht publiziert. Lediglich eine Untersuchung von Duerrwald et al. (2013) zeigte, dass das Virus Potsdam/15 auch in seinem natürlichen Wirt, dem Schwein, empfindlich gegenüber Oseltamivir reagiert.

Wie bereits zuvor für mpJena/5258 beobachtet, resultierte die Behandlung der HA-G222-mpJena/5258- und mpPotsdam/15-Infektion in der Maus mit 75 mg/kg/d Ribavirin in einer 100 %igen Überlebensrate und sorgte für eine signifikante Steigerung der mittleren

Überlebenszeit, einer Senkung des klinischen Scores und des Lungentiters am Tag 4 p. i. (Abbildung 21, 22, 24 und 25, Tabelle 15 und 18). Zusätzlich hatte Ribavirin in mpPotsdam/15-infizierten Mäusen eine signifikante Wirkung auf die Körpergewichtsänderung sowie das Lungengewicht und den histopathologischen Score am Tag 4 p. i.). Damit konnte die in der Literatur beschriebene Wirksamkeit gegen A(H1N1)pdm09-Viren, die an die Maus adaptiert wurden (Julander et al. 2011, Zarogiannis et al. 2012) und gegen nicht adaptierte Viren (Rowe et al. 2010) bestätigt werden. Zudem ist dies der erste Bericht über die Behandelbarkeit eines porzinen, *avian-like* H1N1-Virus mit Ribavirin in der Maus. Die schlechte Wirkung von Ribavirin, die in einem Zell-basierten Test für alle untersuchten Viren gefunden wurde (Tabelle 9 und 17), wurde im Mausmodell nicht bestätigt. Da für die Wirkung von Ribavirin erst die Umwandlung in das aktive, phosphorylierte Metabolit durch Adenosinkinase notwendig ist, kann eine verringerte Aktivität dieses Enzyms in den für die Tests verwendeten MDCK-Zellen eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse sein. So wurde in einer Studie von Mori et al. (2013) berichtet, dass sich die Wirkung von Ribavirin gegen ein Hepatitis C-Virus in verschiedenen Zelllinien aufgrund einer unterschiedlichen Adenosinkinaseaktivität verändert.

Seit der Freigabe von Oseltamivir und Zanamivir zur Behandlung der Influenza beim Mensch wird über deren tatsächliche Wirkung und die Bedingungen, die zur Zulassung geführt haben, kontrovers diskutiert (Jefferson et al. 2014, Muthuri et al. 2014). Eine kürzlich veröffentlichte Meta-Analyse-Studie zur Wirkung von NAI bei hospitalisierten Patienten mit einer A(H1N1)pdm09-Infektion ergab, dass eine NAI-Behandlung gegenüber keiner Behandlung genauso wie eine Behandlung innerhalb von 48 Stunden nach Einsetzen der ersten Symptome im Vergleich zu einer späteren Behandlung bei Erwachsenen zu einer Verringerung der Mortalitätsrate führte (Muthuri et al. 2014). Dies traf jedoch nicht für Kinder zu.

Das in dieser Arbeit als Kontrollsubstanz eingesetzte Ribavirin ist aufgrund seiner guten Wirkung eine mögliche Alternative und wurde im Rahmen einer „*emergency investigational new drug*“ (EIND)-Anwendung bereits mehrfach zur Therapie einer schweren Influenza eingesetzt (Chan-Tack et al. 2009). Die durch Ribavirin ausgelösten Nebenwirkungen wie eine hämolytische Anämie (Rusmann et al. 2006) und der teratogene Effekt (Kochhar et al. 1980) der Substanz sprechen jedoch gegen eine breite Anwendung.

Aufgrund der weit verbreiteten Resistenzen gegen die M2-Ionenkanalblocker und der Gefahr einer schnellen Resistenzentstehung gegenüber den zugelassenen NAI, ist die Suche nach neuen anti-Influenza-Wirkstoffen dringend erforderlich. Dabei wird versucht, die Wirksamkeit bereits bekannter Substanzen durch eine veränderte Applikation zu verbessern

(beispielsweise intravenöse Gabe von Zanamivir), andere virale Proteine (unter anderem auch das HA) als Ziel für die Behandlung zu nutzen oder Signalwege des Wirts so zu verändern, dass die Virusreplikation nicht mehr möglich ist (Das et al. 2010, Du et al. 2012, Hayden 2013). Ein vielversprechendes Medikament stellt das erst kürzlich in Japan zugelassene Favipiravir (T-705) dar. Es inhibiert selektiv die RNA-abhängige RNA-Polymerase von Influenzaviren sowie zahlreicher anderer RNA-Viren (Furuta et al. 2013). Zudem wird der Einsatz von Kombinationstherapien untersucht, um der Entstehung von Resistenzen vorzubeugen (Govorkova und Webster 2010). Tiermodelle, speziell das Mausmodell, spielen bei der Entwicklung und Testung neuer Medikamente und Kombinationstherapien eine wichtige Rolle.

Die in dieser Arbeit etablierten Modelle können aufgrund ihrer guten Charakterisierung in der Maus zur Untersuchung der Wirksamkeit neuer potentieller Virustatika eingesetzt werden (Tabelle 21). Das A(H1N1)pdm09-Virus mpJena/5258 verursacht ohne eine vorherige Adaption eine schwere Influenza in Mäusen und ist somit grundsätzlich für die Testung neuer Wirkstoffe geeignet. Denn für bereits publizierte Studien zur Substanztestung wurden humane Viren über mehrere Passagen in der Mauslunge an den neuen Wirt adaptiert, um eine schwere Erkrankung hervorzurufen (Bantia et al. 2011, Smee et al. 2010, Smee et al. 2006). Dies zog Mutationen im Genom des Virus, zumeist im HA-Gensegment, nach sich, deren Einfluss auf die Substanzwirkung nicht abschätzbar sind. Ein Nachteil von mpJena/5258 stellt die mangelnde Oseltamivir-Empfindlichkeit dar, die aus einer schlechten NA-HA-Balance des Virus in der Maus resultiert. Darum ist dieses Modell für die Untersuchung neuer NAI ungeeignet. Jedoch kann Ribavirin als Kontrollsubstanz genutzt werden. Mit dem Vorhandensein eines HA-222D/G-Polymorphismus weist mpJena/5258 eine Besonderheit auf. Dieser Polymorphismus begünstigt die schnelle Evolution und damit die Anpassung des Virus an die Maus als Wirt. Somit sind Substanzen, die in diesem Modell eine Wirkung aufweisen, möglicherweise in der Lage eine schnelle Anpassung nach einem Wirtswechsel, wie sie im Falle der Entstehung von Pandemien zu beobachten ist, zu verhindern.

Das Mausmodell mit dem Plaque-gereinigten Virus HA-G222-mpJena/5258 weist aufgrund des HA-G222 eine etwas bessere funktionelle NA-HA-Balance in der Maus auf, die eine geringe NAI-Empfindlichkeit zur Folge hat. Da ein HA-G222 in A(H1N1)pdm09-Viren mit schweren Erkrankungen im Mensch und in der Maus assoziiert ist, eignet sich dieses Virus zur Testung potentieller Virustatika, die diese schweren Krankheitsverläufe verhindern. In diesem Mausmodell können Oseltamivir in hohen Konzentrationen sowie Ribavirin als Kontrollsubstanzen eingesetzt werden.

Tabelle 21: Charakteristika und Anwendungsmöglichkeiten der Mausmodelle mit mpJena/5258, HA-G222-mpJena/5258 und mpPotsdam/15

Virus	Charakteristika	Anwendungsmöglichkeiten
mpJena/5258	<ul style="list-style-type: none"> - A(H1N1)pdm09-Virus - nicht Maus-adaptiert - HA-222D/G-Polymorphismus verursacht schwere Influenza mit einem späten, zweiten Symptomm Höhepunkt - nur Ribavirin (nicht Oseltamivir) als Kontrollsubstanz einsetzbar 	<ul style="list-style-type: none"> - testet die Wirksamkeit von potentiellen Virustatika die eine schnelle Wirtsanpassung verhindern (z. B. bei Pandemien) - nicht für NAI geeignet
HA-G222-mpJena/5258	<ul style="list-style-type: none"> - A(H1N1)pdm09-Virus - nicht Maus-adaptiert (natürliche HA-G222-Variante) - verursacht schwere Influenza - Oseltamivir (in hohen Konzentrationen) und Ribavirin als Kontrollsubstanzen einsetzbar 	<ul style="list-style-type: none"> - Testung von potentiellen Virustatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen - bedingt für NAI geeignet
mpPotsdam/15	<ul style="list-style-type: none"> - porcines, <i>avian-like</i> H1N1-IAV - nicht Maus-adaptiert (besitzt Merkmale, die starke Pathogenität in der Maus begünstigen) - verursacht schnell voranschreitende, schwere/fatale Influenza - Oseltamivir und Ribavirin als Kontrollsubstanzen einsetzbar 	<ul style="list-style-type: none"> - breite Testung von potentiellen Virustatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen

Das porcine, *avian-like* H1N1-Isolat mpPotsdam/15 ist aufgrund seiner Oseltamivir- und Ribavirin-Empfindlichkeit in der Maus besonders für die Austestung der Wirksamkeit neuer Substanzen geeignet. Es gilt jedoch zu beachten, dass es sich bei mpPotsdam/15 um ein porcines IAV handelt. Ergebnisse mit diesem Modellsystem sollten daher mit geeigneten humanen IAV bestätigt werden. Der aviäre Ursprung von mpPotsdam/15 und die verhältnismäßig kurze Evolution im Schwein scheinen für die gute Anpassung an die Replikation im murinen Respirationstrakt verantwortlich zu sein. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist die Grundlage dieser Anpassung eine gute NA-HA-Balance, die es ermöglicht, auch die Wirkung von NAI in diesem Mausmodell untersuchen zu können.

6 Schlussfolgerungen

Die Aminosäuresubstitution HA-D222G bzw. ein HA-222D/G-Polymorphismus werden als Ursache für die starke Pathogenität von A(H1N1)pdm09-Viren im Mensch und in der Maus kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Dissertation wurde am Beispiel des A(H1N1)pdm09-Virus mpJena/5258 und des porcinen, *avian-like* H1N1-Virus mpPotsdam/15 der Einfluss der HA-222 auf die Pathogenität von H1N1-Viren untersucht. Da die HA-222 Teil der Rezeptorbindestelle ist und sich Substitutionen dieser Aminosäure auf die funktionelle NA-HA-Balance auswirken könnten, erfolgten zudem Untersuchungen zur Bedeutung der HA-222 für die NAI-Empfindlichkeit dieser Viren. Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Der HA-222D/G-Polymorphismus ermöglicht A(H1N1)pdm09-Viren eine Änderung im Organotropismus im Mausmodell. Dies kann eine in zwei Phasen verlaufende Virusreplikation auslösen, welche wiederum mit einem biphasischen Krankheitsverlauf korreliert. Die mit mpJena/5258 im Mausmodell erhobenen Daten verdeutlichen an einem konkreten Beispiel, dass Quasispezies die Evolution von IAV in einem neuen Wirt unterstützen.
- Ein HA-G222 in A(H1N1)pdm09-Viren ist mit einer erhöhten Pathogenität in BALB/c-Mäusen assoziiert, da die Erkennung von SA α 2,3Gal-Rezeptoren, welche im murinen Respirationstrakt überwiegen, verbessert wird. Außerdem trägt ein HA-G222 zur schlechteren Erkennung durch neutralisierende Antikörper bei, was die Viruseliminierung verzögert. Die Experimente mit mpPotsdam/15 in BALB/c-Mäusen bestätigen diese Schlussfolgerung. Dieses porcine IAV bindet stark an SA α 2,3Gal und erwies sich als hochpathogen. Es besitzt ebenfalls ein HA-G222 sowie weitere für H1N1-Viren beschriebene Adaptionmutationen im HA.
- Die Untersuchung der NAI-Empfindlichkeit von mpJena/5258, der Plaque-gereinigten Variante HA-G222-mpJena/5258 und mpPotsdam/15 beweist, dass die NAI-Empfindlichkeit von IAV *in vitro* nur bedingt mit dem therapeutischen Effekt von Oseltamivir *in vivo* korreliert. Die unterschiedliche funktionelle Balance zwischen HA und NA in den jeweiligen Testsystemen stellt die Ursache hierfür dar. Aus der besseren Oseltamivir-Sensitivität von H1N1-IAV mit einem HA-G222 in der Maus lässt sich indirekt schlussfolgern, dass ein HA-G222 bei den untersuchten Viren das funktionelle Gleichgewicht von NA und HA im Mausmodell verbessert. Somit gelang es, den für *In vitro*-Testsysteme bereits beschriebenen Zusammenhang zwischen der NAI-

Empfindlichkeit und der NA-HA-Balance *in vivo* nachzuweisen. Ribavirin, ein von dieser Balance unabhängig wirkendes Nukleosidanalogon, zeigte gegen alle untersuchten Viren einen signifikanten therapeutischen Effekt in der Maus.

- Die innerhalb dieser Dissertation etablierten Mausmodelle mit mpJena/5258, HA-G222-mpJena/5258 und mpPotsdam/15 sind für die Testung neuer Anti-Influenza-Wirkstoffe geeignet, die infolge der eingeschränkten Verfügbarkeit zugelassender Medikamente dringend benötigt werden. Wegen seiner Unempfindlichkeit gegenüber Oseltamivir kann das mpJena/5258-Mausmodell nicht zur Bestätigung der *In vivo*-Wirkung neuer NAI eingesetzt werden. Es stellt jedoch ein gutes Modell für die Untersuchung von Wirkstoffen mit anderen Targets dar, die wie Ribavirin eine schnelle Virusanpassung an den Wirt verhindern. In HA-G222-mpJena/5258-infizierten Mäusen können potentielle Virustatika auf ihre Wirksamkeit gegen ein nicht adaptiertes, stark pathogenes A(H1N1)pdm09-Virusisolat getestet werden. Das mit dem porzinen Virus mpPotsdam/15 etablierte Mausmodell ermöglicht aufgrund seiner guten Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Ribavirin eine breite Testung neuer potentieller Virustatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, einschließlich NAI.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Hayden FG, Nguyen DH, de Jong MD, Naghdaliyev A, Peiris JS, Shindo N, Soeroso S, Uyeki TM. 2008. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med*, 358 (3):261-273.
- Abe Y, Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Hongo S. 2004. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol*, 78 (18):9605-9611.
- Abed Y, Goyette N, Boivin G. 2004. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antivir Ther*, 9 (4):577-581.
- Abed Y, Goyette N, Boivin G. 2005. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (2):556-559.
- Abed Y, Pizzorno A, Bouhy X, Boivin G. 2011a. Role of permissive neuraminidase mutations in influenza A/Brisbane/59/2007-like (H1N1) viruses. *PLoS Pathog*, 7 (12):e1002431.
- Abed Y, Pizzorno A, Hamelin ME, Leung A, Joubert P, Couture C, Kobasa D, Boivin G. 2011b. The 2009 pandemic H1N1 D222G hemagglutinin mutation alters receptor specificity and increases virulence in mice but not in ferrets. *J Infect Dis*, 204 (7):1008-1016.
- Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Muller CW, Ruigrok RW, Baudin F. 2003. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J*, 22 (18):4646-4655.
- Alexander DJ. 2007. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 25 (30):5637-5644.
- Amorij JP, Huckriede A, Wilschut J, Frijlink HW, Hinrichs WL. 2008. Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharm Res*, 25 (6):1256-1273.
- Babu YS, Chand P, Bantia S, Kotian P, Dehghani A, El-Kattan Y, Lin TH, Hutchison TL, Elliott AJ, Parker CD, Ananth SL, Horn LL, Laver GW, Montgomery JA. 2000. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem*, 43 (19):3482-3486.
- Baccam P, Beauchemin C, Macken CA, Hayden FG, Perelson AS. 2006. Kinetics of influenza A virus infection in humans. *J Virol*, 80 (15):7590-7599.
- Bantia S, Kellogg D, Parker C, Upshaw R, Ilyushina NA, Babu YS. 2011. A single intramuscular injection of neuraminidase inhibitor peramivir demonstrates antiviral activity against novel pandemic A/California/04/2009 (H1N1) influenza virus infection in mice. *Antiviral Res*, 90 (1):17-21.
- Barnard DL. 2009. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*, 82 (2):A110-122.
- Bauer K. 2010. Untersuchungen zur Virustatikaempfindlichkeit von Influenza-A-Viren vom Subtyp H1 [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Bauer K, Durrwald R, Schlegel M, Pfarr K, Topf D, Wiesener N, Dahse HM, Wutzler P, Schmidtke M. 2012. Neuraminidase inhibitor susceptibility of swine influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2008. *Med Microbiol Immunol*, 201 (1):61-72.
- Bause E. 1983. Structural Requirements of N-Glycosylation of Proteins - Studies with Proline Peptides as Conformational Probes. *Biochemical Journal*, 209 (2):331-336.

- Baz M, Abed Y, Papenburg J, Bouhy X, Hamelin ME, Boivin G. 2009. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med*, 361 (23):2296-2297.
- Belser JA, Bridges CB, Katz JM, Tumpey TM. 2009. Past, present, and possible future human infection with influenza virus A subtype H7. *Emerg Infect Dis*, 15 (6):859-865.
- Belser JA, Jayaraman A, Raman R, Pappas C, Zeng H, Cox NJ, Katz JM, Sasisekharan R, Tumpey TM. 2011. Effect of D222G mutation in the hemagglutinin protein on receptor binding, pathogenesis and transmissibility of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *PLoS One*, 6 (9):e25091.
- Belshe RB, Burk B, Newman F, Cerruti RL, Sim IS. 1989. Resistance of influenza A virus to amantadine and rimantadine: results of one decade of surveillance. *J Infect Dis*, 159 (3):430-435.
- Bertram S, Glowacka I, Blazejewska P, Soilleux E, Allen P, Danisch S, Steffen I, Choi SY, Park Y, Schneider H, Schughart K, Pohlmann S. 2010. TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J Virol*, 84 (19):10016-10025.
- Beyer WE, McElhaney J, Smith DJ, Monto AS, Nguyen-Van-Tam JS, Osterhaus AD. 2013. Cochrane re-arranged: support for policies to vaccinate elderly people against influenza. *Vaccine*, 31 (50):6030-6033.
- Bizebard T, Gigant B, Rigolet P, Rasmussen B, Diat O, Bosecke P, Wharton SA, Skehel JJ, Knossow M. 1995. Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature*, 376 (6535):92-94.
- Blick TJ, Sahasrabudhe A, McDonald M, Owens IJ, Morley PJ, Fenton RJ, McKimm-Breschkin JL. 1998. The interaction of neuraminidase and hemagglutinin mutations in influenza virus in resistance to 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Virology*, 246 (1):95-103.
- Bloom JD, Gong LI, Baltimore D. 2010. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science*, 328 (5983):1272-1275.
- Bottcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M. 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol*, 80 (19):9896-9898.
- Bouvier NM, Lowen AC. 2010. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses*, 2 (8):1530-1563.
- Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI. 2005. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*, 366 (9492):1175-1181.
- Brockwell-Staats C, Webster RG, Webby RJ. 2009. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). *Influenza Other Respir Viruses*, 3 (5):207-213.
- Brookes DW, Miah S, Lackenby A, Hartgroves L, Barclay WS. 2011. Pandemic H1N1 2009 influenza virus with the H275Y oseltamivir resistance neuraminidase mutation shows a small compromise in enzyme activity and viral fitness. *J Antimicrob Chemother*, 66 (3):466-470.
- Brown IH. 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, 74 (1-2):29-46.
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, 371 (6492):37-43.
- Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S. 1992. The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J*, 11 (1):49-56.
- Cardona CJ, Xing Z, Sandrock CE, Davis CE. 2009. Avian influenza in birds and mammals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 32 (4):255-273.

- Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*, 31 (2 Pt 1):417-427.
- Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol*, 71 (Pt 12):3075-3080.
- Chan-Tack KM, Murray JS, Birnkrant DB. 2009. Use of ribavirin to treat influenza. *N Engl J Med*, 361 (17):1713-1714.
- Chan PK, Lee N, Joynt GM, Choi KW, Cheung JL, Yeung AC, Lam P, Wong R, Leung BW, So HY, Lam WY, Hui DC. 2011. Clinical and virological course of infection with haemagglutinin D222G mutant strain of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *J Clin Virol*, 50 (4):320-324.
- Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, Viswanathan K, Raguram S, Tumpey TM, Sasisekharan V, Sasisekharan R. 2008. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnol*, 26 (1):107-113.
- Chen H, Cheung CL, Tai H, Zhao P, Chan JF, Cheng VC, Chan KH, Yuen KY. 2009. Oseltamivir-resistant influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis*, 15 (12):1970-1972.
- Chen H, Wen X, To KK, Wang P, Tse H, Chan JF, Tsoi HW, Fung KS, Tse CW, Lee RA, Chan KH, Yuen KY. 2010. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. *J Infect Dis*, 201 (10):1517-1521.
- Chen J, Skehel JJ, Wiley DC. 1999. N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (16):8967-8972.
- Chen LM, Rivaller P, Hossain J, Carney P, Balish A, Perry I, Davis CT, Garten R, Shu B, Xu X, Klimov A, Paulson JC, Cox NJ, Swenson S, Stevens J, Vincent A, Gramer M, Donis RO. 2011. Receptor specificity of subtype H1 influenza A viruses isolated from swine and humans in the United States. *Virology*, 412 (2):401-410.
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 7 (12):1306-1312.
- Chen Y, Shiota M, Ohuchi M, Towatari T, Tashiro J, Murakami M, Yano M, Yang B, Kido H. 2000. Mast cell tryptase from pig lungs triggers infection by pneumotropic Sendai and influenza A viruses. Purification and characterization. *Eur J Biochem*, 267 (11):3189-3197.
- Childs RA, Palma AS, Wharton S, Matrosovich T, Liu Y, Chai W, Campanero-Rhodes MA, Zhang Y, Eickmann M, Kiso M, Hay A, Matrosovich M, Feizi T. 2009. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nat Biotechnol*, 27 (9):797-799.
- Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. 2005. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *J Virol*, 79 (16):10821-10825.
- Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J, Lowen AC, Ye J, van Riel D, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, Koel B, Burke DF, Sutherland-Cash KH, Whittleston CS, Russell CA, Wales DJ, Smith DJ, Jonges M, Meijer A, Koopmans M, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD, Garcia-Sastre A, Perez DR, Fouchier RA. 2010. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding. *J Virol*, 84 (22):11802-11813.

- Collins PJ, Haire LF, Lin YP, Liu J, Russell RJ, Walker PA, Martin SR, Daniels RS, Gregory V, Skehel JJ, Gamblin SJ, Hay AJ. 2009. Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine*, 27 (45):6317-6323.
- Colman PM, Varghese JN, Laver WG. 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, 303 (5912):41-44.
- Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC. 1993. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol*, 67 (6):2972-2980.
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 205 (1):17-23.
- Copeland CS, Doms RW, Bolzau EM, Webster RG, Helenius A. 1986. Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J Cell Biol*, 103 (4):1179-1191.
- Cross KJ, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC, Steinhauer DA. 2001. Studies on influenza haemagglutinin fusion peptide mutants generated by reverse genetics. *EMBO J*, 20 (16):4432-4442.
- Cross KJ, Langley WA, Russell RJ, Skehel JJ, Steinhauer DA. 2009. Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept Lett*, 16 (7):766-778.
- Crotty S, Andino R. 2002. Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes Infect*, 4 (13):1301-1307.
- Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, Arnold E. 2010. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol*, 17 (5):530-538.
- Das SR, Hensley SE, David A, Schmidt L, Gibbs JS, Puigbo P, Ince WL, Bennink JR, Yewdell JW. 2011. Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (51):E1417-1422.
- Davies WL, Grunert RR, Haff RF, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, Watts JC, Wood TR, Hermann EC, Hoffmann CE. 1964. Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine). *Science*, 144 (3620):862-863.
- Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, Bandaranayake D, Breiman RF, Brooks WA, Buchy P, Feikin DR, Fowler KB, Gordon A, Hien NT, Horby P, Huang QS, Katz MA, Krishnan A, Lal R, Montgomery JM, Molbak K, Pebody R, Presanis AM, Razuri H, Steens A, Tinoco YO, Wallinga J, Yu H, Vong S, Bresee J, Widdowson MA. 2012. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*, 12 (9):687-695.
- de Jong JC, Beyer WE, Palache AM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. 2000. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol*, 61 (1):94-99.
- de Jong JC, Smith DJ, Lapedes AS, Donatelli I, Campitelli L, Barigazzi G, Van Reeth K, Jones TC, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. 2007. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol*, 81 (8):4315-4322.
- de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, Hoang DM, Chau NV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam BV, Ha do Q, Guan Y, Peiris JS, Chinh NT, Hien TT, Farrar J. 2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 12 (10):1203-1207.
- Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, Shu Y, Gubareva LV, Cox NJ, Klimov AI. 2007. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis*, 196 (2):249-257.

- Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW. 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, 458 (7240):914-918.
- DiazGranados CA, Denis M, Plotkin S. 2012. Seasonal influenza vaccine efficacy and its determinants in children and non-elderly adults: a systematic review with meta-analyses of controlled trials. *Vaccine*, 31 (1):49-57.
- Domingo E, Sheldon J, Perales C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76 (2):159-216.
- Du J, Cross TA, Zhou HX. 2012. Recent progress in structure-based anti-influenza drug design. *Drug Discov Today*, 17 (19-20):1111-1120.
- Duan S, Boltz DA, Seiler P, Li J, Bragstad K, Nielsen LP, Webby RJ, Webster RG, Govorkova EA. 2010. Oseltamivir-resistant pandemic H1N1/2009 influenza virus possesses lower transmissibility and fitness in ferrets. *PLoS Pathog*, 6 (7):e1001022.
- Duerrwald R, Schlegel M, Bauer K, Vissienon T, Wutzler P, Schmidtke M. 2013. Efficacy of influenza vaccination and tamiflu(R) treatment--comparative studies with Eurasian Swine influenza viruses in pigs. *PLoS One*, 8 (4):e61597.
- Duwe S, Schweiger B. 2008. A new and rapid genotypic assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistant influenza A viruses of subtype H1N1, H3N2, and H5N1. *J Virol Methods*, 153 (2):134-141.
- Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, Goudsmit J, Wilson IA. 2009. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*, 324 (5924):246-251.
- Falcone V, Bierbaum S, Kern W, Kontny U, Bertz H, Huzly D, Panning M. 2013. Influenza virus A(H1N1)pdm09 hemagglutinin polymorphism and associated disease in southern Germany during the 2010/11 influenza season. *Arch Virol*, 158 (6):1297-1303.
- Ferraris O, Lina B. 2008. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol*, 41 (1):13-19.
- Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM. 2011. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza --- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, 60 (1):1-24.
- Fitch WM, Leiter JM, Li XQ, Palese P. 1991. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (10):4270-4274.
- Fodor E. 2013. The RNA polymerase of influenza a virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol*, 57 (2):113-122.
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (5):1356-1361.
- Francis T, Magill TP. 1937. The Antibody Response of Human Subjects Vaccinated with the Virus of Human Influenza. *J Exp Med*, 65 (2):251-259.
- Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. 2013. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*, 100 (2):446-454.
- Gallagher PJ, Henneberry JM, Sambrook JF, Gething MJH. 1992. Glycosylation Requirements for Intracellular-Transport and Function of the Hemagglutinin of Influenza-Virus. *Journal of Virology*, 66 (12):7136-7145.
- Gambaryan AS, Marinina VP, Tuzikov AB, Bovin NV, Rudneva IA, Sinitsyn BV, Shilov AA, Matrosovich MN. 1998. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties of H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs. *Virology*, 247 (2):170-177.

- Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, Vasisht N, Steinhauer DA, Daniels RS, Elliot A, Wiley DC, Skehel JJ. 2004. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*, 303 (5665):1838-1842.
- Garcia-Sastre A. 2012. The neuraminidase of bat influenza viruses is not a neuraminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (46):18635-18636.
- Garrison M, Weldon L, Brantley P, Wolf L, Davies M, Maillard JM, Moore Z, Sheu T, Deyde V, Gubareva L, Fry AM, Fleischauer A, Dailey NJ. 2009. Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis--North Carolina, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 58 (35):969-972.
- Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivaller P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier RA, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, Lopez-Gatell H, Olivera H, Lopez I, Myers CA, Faix D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD, Jr., Boxrud D, Sambol AR, Abid SH, St George K, Bannerman T, Moore AL, Stringer DJ, Blevins P, Demmler-Harrison GJ, Ginsberg M, Kriner P, Waterman S, Smole S, Guevara HF, Belongia EA, Clark PA, Beatrice ST, Donis R, Katz J, Finelli L, Bridges CB, Shaw M, Jernigan DB, Uyeki TM, Smith DJ, Klimov AI, Cox NJ. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 325 (5937):197-201.
- Gen F, Yamada S, Kato K, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T. 2013. Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. *Arch Virol*, 158 (5):1003-1011.
- Gerhard W, Webster RG. 1978. Antigenic drift in influenza A viruses. I. Selection and characterization of antigenic variants of A/PR/8/34 (HON1) influenza virus with monoclonal antibodies. *J Exp Med*, 148 (2):383-392.
- Gerlach T, Kuhling L, Uhlendorff J, Laukemper V, Matrosovich T, Czudai-Matwich V, Schwalm F, Klenk HD, Matrosovich M. 2012. Characterization of the neuraminidase of the H1N1/09 pandemic influenza virus. *Vaccine*, 30 (51):7348-7352.
- Gething MJ, McCammon K, Sambrook J. 1986. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell*, 46 (6):939-950.
- Glaser L, Stevens J, Zamarin D, Wilson IA, Garcia-Sastre A, Tumpey TM, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P. 2005. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol*, 79 (17):11533-11536.
- Govorkova EA, Webster RG. 2010. Combination chemotherapy for influenza. *Viruses*, 2 (8):1510-1529.
- Graci JD, Cameron CE. 2006. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol*, 16 (1):37-48.
- Grienke U, Braun H, Seidel N, Kirchmair J, Richter M, Krumbholz A, von Grafenstein S, Liedl KR, Schmidtke M, Rollinger JM. 2014. Computer-guided approach to access the anti-influenza activity of licorice constituents. *J Nat Prod*, 77 (3):563-570.
- Gubareva L, Okomo-Adhiambo M, Deyde V, Fry AM, Sheu TG, Garten R, Smith CB, Barnes J, Myrick A, Hillman M, Shaw M, Bridges C, Klimov A, Cox N. 2009. Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 58 (16):433-435.
- Gubareva LV, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Mishin VP, Deyde VM, Sleeman K, Nguyen HT, Sheu TG, Garten RJ, Shaw MW, Fry AM, Klimov AI. 2010.

- Comprehensive assessment of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus drug susceptibility in vitro. *Antivir Ther*, 15 (8):1151-1159.
- Hamelin ME, Baz M, Abed Y, Couture C, Joubert P, Beaulieu E, Bellerose N, Plante M, Mallett C, Schumer G, Kobinger GP, Boivin G. 2010. Oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 virus is as virulent as its wild-type counterpart in mice and ferrets. *PLoS Pathog*, 6 (7):e1001015.
- Harvala H, Gunson R, Simmonds P, Hardie A, Bennett S, Scott F, Roddie H, McKnight J, Walsh T, Rowney D, Clark A, Bremner J, Aitken C, Templeton K. 2010. The emergence of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus amongst hospitalised immunocompromised patients in Scotland, November-December, 2009. *Eurosurveillance*, 15 (14):2-4.
- Hauge S, Madhun A, Cox RJ, Haaheim LR. 2007. Quality and kinetics of the antibody response in mice after three different low-dose influenza virus vaccination strategies. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (8):978-983.
- Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. 2009. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis*, 15 (2):155-162.
- Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*, 4 (11):3021-3024.
- Hayden FG. 2013. Newer influenza antivirals, biotherapeutics and combinations. *Influenza Other Respir Viruses*, 7 Suppl 1:63-75.
- Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, Lobo M, Betts RF, Miller M, Kinnersley N, Mills RG, Ward P, Straus SE. 1999. Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza - Randomized controlled trials for prevention and treatment. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 282 (13):1240-1246.
- Herlocher ML, Truscon R, Elias S, Yen HL, Roberts NA, Ohmit SE, Monto AS. 2004. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis*, 190 (9):1627-1630.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 146 (12):2275-2289.
- Hurt AC, Holien JK, Parker MW, Barr IG. 2009. Oseltamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in seasonal, pandemic and highly pathogenic influenza viruses. *Drugs*, 69 (18):2523-2531.
- Hurt AC, Chotpitayasunondh T, Cox NJ, Daniels R, Fry AM, Gubareva LV, Hayden FG, Hui DS, Hungnes O, Lackenby A, Lim W, Meijer A, Penn C, Tashiro M, Uyeki TM, Zambon M, Pandemic WC. 2012. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives. *Lancet Infectious Diseases*, 12 (3):240-248.
- Ibricevic A, Pekosz A, Walter MJ, Newby C, Battaile JT, Brown EG, Holtzman MJ, Brody SL. 2006. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol*, 80 (15):7469-7480.
- ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. Release 2012 <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechei D, Kida H, Takada A. 2010. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One*, 5 (1):e8553.
- Ilyushina NA, Hay A, Yilmaz N, Boon AC, Webster RG, Govorkova EA. 2008. Oseltamivir-ribavirin combination therapy for highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (11):3889-3897.
- Ilyushina NA, Kharenkov AM, Seiler JP, Forrest HL, Bovin NV, Marjuki H, Barman S, Webster RG, Webby RJ. 2010. Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice. *J Virol*, 84 (17):8607-8616.

- Inoue M, Barkham T, Leo YS, Chan KP, Chow A, Wong CW, Lee RTC, Maurer-Stroh S, Lin R, Lin C. 2010. Emergence of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus within 48 Hours. *Emerg Infect Dis*, 16 (10):1633-1636.
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*, 72 (9):7367-7373.
- Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. 2009. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*, 460 (7258):1021-1025.
- Ives JA, Carr JA, Mendel DB, Tai CY, Lambkin R, Kelly L, Oxford JS, Hayden FG, Roberts NA. 2002. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res*, 55 (2):307-317.
- Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 337 (6091):199-204.
- Jefferson T, Demicheli V, Di Pietrantonj C, Rivetti D. 2006. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD001169.
- Jefferson T, Jones MA, Doshi P, Del Mar CB, Hama R, Thompson MJ, Spencer EA, Onakpoya I, Mahtani KR, Nunan D, Howick J, Heneghan CJ. 2014. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*, 4:CD008965.
- Jia D, Rahbar R, Chan RW, Lee SM, Chan MC, Wang BX, Baker DP, Sun B, Peiris JS, Nicholls JM, Fish EN. 2010. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PLoS One*, 5 (11):e13927.
- Johnson NP, Mueller J. 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med*, 76 (1):105-115.
- Julander JG, Hagloch J, Latimer S, Motter N, Dagley A, Barnard DL, Smee DF, Morrey JD. 2011. Use of plethysmography in assessing the efficacy of antivirals in a mouse model of pandemic influenza A virus. *Antiviral Res*, 92 (2):228-236.
- Kaverin NV, Matrosovich MN, Gambaryan AS, Rudneva IA, Shilov AA, Varich NL, Makarova NV, Kropotkina EA, Sinitsin BV. 2000. Intergenic HA-NA interactions in influenza A virus: postreassortment substitutions of charged amino acid in the hemagglutinin of different subtypes. *Virus Res*, 66 (2):123-129.
- Kaverin NV, Gambaryan AS, Bovin NV, Rudneva IA, Shilov AA, Khodova OM, Varich NL, Sinitsin BV, Makarova NV, Kropotkina EA. 1998. Postreassortment changes in influenza A virus hemagglutinin restoring HA-NA functional match. *Virology*, 244 (2):315-321.
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*, 63 (11):4603-4608.
- Kelly H, Carville K, Grant K, Jacoby P, Tran T, Barr I. 2009. Estimation of influenza vaccine effectiveness from routine surveillance data. *PLoS One*, 4 (3):e5079.

- Khare GP, Sidwell RW, Witkowski JT, Simon LN, Robins RK. 1973. Suppression by 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) of influenza virus-induced infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 3 (4):517-522.
- Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, Kawaoka Y, Webster RG. 1994. Potential for Transmission of Avian Influenza-Viruses to Pigs. *Journal of General Virology*, 75:2183-2188.
- Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N. 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem*, 267 (19):13573-13579.
- Kilander A, Rykkvin R, Dudman SG, Hungnes O. 2010. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. *Euro Surveill*, 15 (9).
- Kilbourne ED, Johansson BE, Grajower B. 1990. Independent and disparate evolution in nature of influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (2):786-790.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Wu H, Zhang L, Chen X, Escarpe PA, Mendel DB, Laver WG, Stevens RC. 1998. Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J Med Chem*, 41 (14):2451-2460.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC. 1997. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc*, 119 (4):681-690.
- Kim JJ, Park MS. 2012. N-Linked Glycosylation in the Hemagglutinin of Influenza A Viruses. *Yonsei Medical Journal*, 53 (5):886-893.
- Kirchmair J, Rollinger JM, Liedl KR, Seidel N, Krumbholz A, Schmidtke M. 2011. Novel neuraminidase inhibitors: identification, biological evaluation and investigations of the binding mode. *Future Med Chem*, 3 (4):437-450.
- Kiso M, Shinya K, Shimojima M, Takano R, Takahashi K, Katsura H, Kakugawa S, Le MT, Yamashita M, Furuta Y, Ozawa M, Kawaoka Y. 2010. Characterization of oseltamivir-resistant 2009 H1N1 pandemic influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 6 (8):e1001079.
- Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, 68 (2):426-439.
- Klenk HD, Wagner R, Heuer D, Wolff T. 2002. Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Research*, 82 (1-2):73-75.
- Knossow M, Gaudier M, Douglas A, Barrere B, Bizebard T, Barbey C, Gigant B, Skehel JJ. 2002. Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by antibodies. *Virology*, 302 (2):294-298.
- Kochhar DM, Penner JD, Knudsen TB. 1980. Embryotoxic, teratogenic, and metabolic effects of ribavirin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 52 (1):99-112.
- Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, Meijer A, van Steenbergen J, Fouchier R, Osterhaus A, Bosman A. 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*, 363 (9409):587-593.
- Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. 2011. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol*, 200 (2):69-75.

- Krumbholz A, Schmidtke M, Bergmann S, Motzke S, Bauer K, Stech J, Durrwald R, Wutzler P, Zell R. 2009. High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J Gen Virol*, 90 (Pt 4):900-908.
- Krumbholz A, Lange J, Sauerbrei A, Groth M, Platzer M, Kanrai P, Pleschka S, Scholtissek C, Buttner M, Durrwald R, Zell R. 2014. The origin of the European avian-like swine influenza viruses. *J Gen Virol*.
- Kuiken T, Taubenberger JK. 2008. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine*, 26 Suppl 4:D59-66.
- Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. 2010. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One*, 5 (4):e10256.
- Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, Zambon MC. 2008. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill*, 13 (5).
- Lackenby A, Gilad JM, Pebody R, Miah S, Calatayud L, Bolotin S, Vipond I, Muir P, Guiver M, McMenamin J, Reynolds A, Moore C, Gunson R, Thompson CI, Galiano M, Bermingham A, Ellis J, Zambon M. 2011. Continued emergence and changing epidemiology of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)2009 virus, United Kingdom, winter 2010/11. *Eurosurveillance*, 16 (5):10-15.
- Lamb RA, Choppin PW. 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (10):4908-4912.
- Lamb RA, Choppin PW. 1981. Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology*, 112 (2):729-737.
- Lambert ND, Ovsyannikova IG, Pankratz VS, Jacobson RM, Poland GA. 2012. Understanding the immune response to seasonal influenza vaccination in older adults: a systems biology approach. *Expert Rev Vaccines*, 11 (8):985-994.
- Lazarowitz SG, Choppin PW. 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*, 68 (2):440-454.
- Le QM, Wertheim HF, Tran ND, van Doorn HR, Nguyen TH, Horby P. 2010. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med*, 362 (1):86-87.
- Leser GP, Lamb RA. 2005. Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology*, 342 (2):215-227.
- Liu Y, Childs RA, Matrosovich T, Wharton S, Palma AS, Chai W, Daniels R, Gregory V, Uhlenhorff J, Kiso M, Klenk HD, Hay A, Feizi T, Matrosovich M. 2010. Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus. *J Virol*, 84 (22):12069-12074.
- Londt BZ, Brookes SM, Nash BJ, Nunez A, Stagg DA, Brown IH. 2013. The infectivity of pandemic 2009 H1N1 and avian influenza viruses for pigs: an assessment by ex vivo respiratory tract organ culture. *Influenza Other Respir Viruses*, 7 (3):393-402.
- Magnussen CR, Douglas RG, Jr., Betts RF, Roth FK, Meagher MP. 1977. Double-blind evaluation of oral ribavirin (Virazole) in experimental influenza A virus infection in volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 12 (4):498-502.
- Mak GC, Au KW, Tai LS, Chuang KC, Cheng KC, Shiu TC, Lim W. 2010. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Euro Surveill*, 15 (14).

- Manchanda H, Seidel N, Krumbholz A, Sauerbrei A, Schmidtke M, Guthke R. 2014. Within-host influenza dynamics: A small-scale mathematical modeling approach. *Biosystems*, 118C:51-59.
- Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, Donatelli I, Kawaoka Y. 2000. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 74 (18):8502-8512.
- McKimm-Breschkin JL. 2013. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses*, 7 Suppl 1:25-36.
- McKimm-Breschkin JL, Rootes C, Mohr PG, Barrett S, Streltsov VA. 2012. In vitro passaging of a pandemic H1N1/09 virus selects for viruses with neuraminidase mutations conferring high-level resistance to oseltamivir and peramivir, but not to zanamivir. *J Antimicrob Chemother*, 67 (8):1874-1883.
- McKimm-Breschkin JL, Blick TJ, Sahasrabudhe A, Tiong T, Marshall D, Hart GJ, Bethell RC, Penn CR. 1996. Generation and characterization of variants of NWS/G70C influenza virus after in vitro passage in 4-amino-Neu5Ac2en and 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Antimicrob Agents Chemother*, 40 (1):40-46.
- McKimm-Breschkin JL, Williams J, Barrett S, Jachno K, McDonald M, Mohr PG, Saito T, Tashiro M. 2013. Reduced susceptibility to all neuraminidase inhibitors of influenza H1N1 viruses with haemagglutinin mutations and mutations in non-conserved residues of the neuraminidase. *J Antimicrob Chemother*, 68 (10):2210-2221.
- Medeiros R, Escriou N, Naffakh N, Manuguerra JC, van der Werf S. 2001. Hemagglutinin residues of recent human A(H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes. *Virology*, 289 (1):74-85.
- Melidou A, Gioula G, Exindari M, Chatzidimitriou D, Malisiovas N. 2014. Genetic analysis of post-pandemic 2010-2011 influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin virus variants that caused mild, severe, and fatal infections in Northern Greece. *J Med Virol*.
- Melidou A, Gioula G, Exindari M, Chatzidimitriou D, Diza E, Malisiovas N. 2010. Molecular and phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of pandemic influenza H1N1 2009 viruses associated with severe and fatal infections. *Virus Res*, 151 (2):192-199.
- Memoli MJ, Bristol T, Proudfoot KE, Davis AS, Dunham EJ, Taubenberger JK. 2012. In vivo evaluation of pathogenicity and transmissibility of influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin receptor binding domain 222 intrahost variants isolated from a single immunocompromised patient. *Virology*, 428 (1):21-29.
- Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam PP, Science M, Kuster SP, Fadel SA, Tran D, Fernandez E, Bhatnagar N, Loeb M. 2013. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 347:f5061.
- Miller RR, MacLean AR, Gunson RN, Carman WF. 2010. Occurrence of haemagglutinin mutation D222G in pandemic influenza A(H1N1) infected patients in the West of Scotland, United Kingdom, 2009-10. *Euro Surveill*, 15 (16).
- Mir-Shekari SY, Ashford DA, Harvey DJ, Dwek RA, Schulze IT. 1997. The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells. A site-specific study. *J Biol Chem*, 272 (7):4027-4036.
- Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, Kawaoka Y. 2000. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*, 74 (13):6015-6020.
- Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA. 2012. Organization of the influenza virus replication machinery. *Science*, 338 (6114):1631-1634.
- Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, Tashiro M, Webster RG, Aymard M, Hayden FG, Zambon M. 2006. Detection of influenza

- viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (7):2395-2402.
- Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. 2013. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology*, 58 (4):1236-1244.
- Moscona A. 2009. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med*, 360 (10):953-956.
- Mould JA, Paterson RG, Takeda M, Ohigashi Y, Venkataraman P, Lamb RA, Pinto LH. 2003. Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Dev Cell*, 5 (1):175-184.
- Munk K, Pritzer E, Kretzschmar E, Gutte B, Garten W, Klenk HD. 1992. Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus haemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology*, 2 (3):233-240.
- Munster VJ, Fouchier RA. 2009. Avian influenza virus: of virus and bird ecology. *Vaccine*, 27 (45):6340-6344.
- Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B, Osterhaus AD, Fouchier RA. 2007. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog*, 3 (5):e61.
- Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA, Kido H. 2001. Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur J Biochem*, 268 (10):2847-2855.
- Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. 2013. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*, 87 (5):2455-2462.
- Muthuri SG, Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Al Khuwaitir TS, Al Mamun A, Anovadiya AP, Azziz-Baumgartner E, Baez C, Bassetti M, Beovic B, Bertisch B, Bonmarin I, Booy R, Borja-Aburto VH, Burgmann H, Cao B, Carratala J, Denholm JT, Dominguez SR, Duarte PA, Dubnov-Raz G, Echavarria M, Fanella S, Gao Z, Gerardin P, Giannella M, Gubbels S, Herberg J, Iglesias AL, Hoger PH, Hu X, Islam QT, Jimenez MF, Kandeel A, Keijzers G, Khalili H, Knight M, Kudo K, Kuszniarz G, Kuzman I, Kwan AM, Amine IL, Langenegger E, Lankarani KB, Leo YS, Linko R, Liu P, Madanat F, Mayo-Montero E, McGeer A, Memish Z, Metan G, Mickiene A, Mikic D, Mohn KG, Moradi A, Nymadawa P, Oliva ME, Ozkan M, Parekh D, Paul M, Polack FP, Rath BA, Rodriguez AH, Sarrouf EB, Seale AC, Sertogullarindan B, Siqueira MM, Skret-Magierlo J, Stephan F, Talarek E, Tang JW, To KK, Torres A, Torun SH, Tran D, Uyeki TM, Van Zwol A, Vaudry W, Vidmar T, Yokota RT, Zarogoulidis P, Nguyen-Van-Tam JS. 2014. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: a meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med*, 2 (5):395-404.
- Myers KP, Olsen CW, Gray GC. 2007. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis*, 44 (8):1084-1088.
- Nakajima K, Desselberger U, Palese P. 1978. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*, 274 (5669):334-339.
- Nelli RK, Kuchipudi SV, White GA, Perez BB, Dunham SP, Chang KC. 2010. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res*, 6:4.
- Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. 2012a. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther*, 17 (1 Pt B):159-173.

- Nguyen HT, Trujillo AA, Sheu TG, Levine M, Mishin VP, Shaw M, Ades EW, Klimov AI, Fry AM, Gubareva LV. 2012b. Analysis of influenza viruses from patients clinically suspected of infection with an oseltamivir resistant virus during the 2009 pandemic in the United States. *Antiviral Res*, 93 (3):381-386.
- Nguyen JT, Smee DF, Barnard DL, Julander JG, Gross M, de Jong MD, Went GT. 2012c. Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin in vivo against susceptible and amantadine-resistant influenza A viruses. *PLoS One*, 7 (1):e31006.
- Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS. 2007. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res*, 8:73.
- Ning ZY, Luo MY, Qi WB, Yu B, Jiao PR, Liao M. 2009. Detection of expression of influenza virus receptors in tissues of BALB/c mice by histochemistry. *Vet Res Commun*, 33 (8):895-903.
- Nobusawa E, Sato K. 2006. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol*, 80 (7):3675-3678.
- Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. 1991. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*, 182 (2):475-485.
- Noh JY, Kim WJ. 2013. Influenza Vaccines: Unmet Needs and Recent Developments. *Infect Chemother*, 45 (4):375-386.
- O'Donnell CD, Vogel L, Wright A, Das SR, Wrammert J, Li GM, McCausland M, Zheng NY, Yewdell JW, Ahmed R, Wilson PC, Subbarao K. 2012. Antibody pressure by a human monoclonal antibody targeting the 2009 pandemic H1N1 virus hemagglutinin drives the emergence of a virus with increased virulence in mice. *MBio*, 3 (3).
- O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J. 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem*, 270 (39):22701-22704.
- Ohuchi M, Ohuchi R, Feldmann A, Klenk HD. 1997. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol*, 71 (11):8377-8384.
- Okomo-Adhiambo M, Sleeman K, Ballenger K, Nguyen HT, Mishin VP, Sheu TG, Smagala J, Li Y, Klimov AI, Gubareva LV. 2010. Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: a laboratory surveillance perspective. *Viruses*, 2 (10):2269-2289.
- Okumura Y, Takahashi E, Yano M, Ohuchi M, Daidoji T, Nakaya T, Bottcher E, Garten W, Klenk HD, Kido H. 2010. Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J Virol*, 84 (10):5089-5096.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA. 2006. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science*, 312 (5772):384-388.
- Palese P. 2004. Influenza: old and new threats. *Nat Med*, 10 (12 Suppl):S82-87.
- Palese P, Shaw ML. 2007. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology*. 5. Aufl.
- Palese P, Wang TT. 2011. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis. *MBio*, 2 (5).
- Parker WB. 2005. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res*, 107 (2):165-171.
- Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P. 1986. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol*, 59 (2):377-383.

- Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shortridge KF. 1999. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, 354 (9182):916-917.
- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 69 (3):517-528.
- Presti RM, Zhao G, Beatty WL, Mihindukulasuriya KA, da Rosa AP, Popov VL, Tesh RB, Virgin HW, Wang D. 2009. Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae. *J Virol*, 83 (22):11599-11606.
- Rameix-Welti MA, Munier S, Le Gal S, Cuvelier F, Agou F, Enouf V, Naffakh N, van der Werf S. 2011. Neuraminidase of 2007-2008 influenza A(H1N1) viruses shows increased affinity for sialic acids due to the D344N substitution. *Antivir Ther*, 16 (4):597-603.
- Reading PC, Tate MD, Pickett DL, Brooks AG. 2007. Glycosylation as a target for recognition of influenza viruses by the innate immune system. *Current Topics in Innate Immunity*, 598:279-292.
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*, 27 (3):493-497.
- Reed SG, Orr MT, Fox CB. 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*, 19 (12):1597-1608.
- Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. 2004. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol*, 2 (11):909-914.
- Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. 1999. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (4):1651-1656.
- Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK. 2000. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (12):6785-6790.
- Resende PC, Motta FC, Oliveira Mde L, Gregianini TS, Fernandes SB, Cury AL, do Carmo DRM, Souza TM, Siqueira MM. 2014. Polymorphisms at residue 222 of the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1)pdm09: association of quasi-species to morbidity and mortality in different risk categories. *PLoS One*, 9 (3):e92789.
- Roberts PC, Garten W, Klenk HD. 1993. Role of Conserved Glycosylation Sites in Maturation and Transport of Influenza-a Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 67 (6):3048-3060.
- Rogers GN, D'Souza BL. 1989. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology*, 173 (1):317-322.
- Rossman JS, Lamb RA. 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411 (2):229-236.
- Rowe T, Banner D, Farooqui A, Ng DC, Kelvin AA, Rubino S, Huang SS, Fang Y, Kelvin DJ. 2010. In vivo ribavirin activity against severe pandemic H1N1 Influenza A/Mexico/4108/2009. *J Gen Virol*, 91 (Pt 12):2898-2906.
- Russmann S, Grattagliano I, Portincasa P, Palmieri VO, Palasciano G. 2006. Ribavirin-induced anemia: mechanisms, risk factors and related targets for future research. *Curr Med Chem*, 13 (27):3351-3357.
- Sakabe S, Ozawa M, Takano R, Iwastuki-Horimoto K, Kawaoka Y. 2011. Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice. *Virus Res*, 158 (1-2):124-129.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12):5463-5467.
- Sato M, Yoshida S, Iida K, Tomozawa T, Kido H, Yamashita M. 2003. A novel influenza A virus activating enzyme from porcine lung: purification and characterization. *Biol Chem*, 384 (2):219-227.

- Schmeisser F, Friedman R, Besho J, Lugovtsev V, Soto J, Wang W, Weiss C, Williams O, Xie H, Ye Z, Weir JP. 2013. Neutralizing and protective epitopes of the 2009 pandemic influenza H1N1 hemagglutinin. *Influenza Other Respir Viruses*, 7 (3):480-490.
- Schmidtke M, Schnittler U, Jahn B, Dahse H, Stelzner A. 2001. A rapid assay for evaluation of antiviral activity against coxsackie virus B3, influenza virus A, and herpes simplex virus type 1. *J Virol Methods*, 95 (1-2):133-143.
- Schmidtke M, Zell R, Bauer K, Krumbholz A, Schrader C, Suess J, Wutzler P. 2006. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology*, 49 (5):286-293.
- Scholtissek C. 1987. Molecular aspects of the epidemiology of virus disease. *Experientia*, 43 (11-12):1197-1201.
- Scholtissek C. 1995. Molecular evolution of influenza viruses. *Virus Genes*, 11 (2-3):209-215.
- Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. 1978. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*, 87 (1):13-20.
- Schrader C, Suss J. 2003. Genetic characterization of a porcine H1N2 influenza virus strain isolated in Germany. *Intervirology*, 46 (1):66-70.
- Schwarzer J, Rapp E, Hennig R, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. 2009. Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine*, 27 (32):4325-4336.
- Seibert CW, Kaminski M, Philipp J, Rubbenstroth D, Albrecht RA, Schwalm F, Stertz S, Medina RA, Kochs G, Garcia-Sastre A, Staeheli P, Palese P. 2010. Oseltamivir-resistant variants of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus are not attenuated in the guinea pig and ferret transmission models. *J Virol*, 84 (21):11219-11226.
- Seidel N. 2011. Charakterisierung der Pathogenität und Neuraminidasehemmer-Empfindlichkeit von pandemischen Influenza-A (H1N1) 2009-Viren *in vitro* und *in vivo* [Diplomarbeit]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Seidel N, Sauerbrei A, Wutzler P, Schmidtke M. 2014. Hemagglutinin 222D/G Polymorphism Facilitates Fast Intra-Host Evolution of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Viruses. *PLoS One*, 9 (8):e104233.
- Sekikawa K, Lai CJ. 1983. Defects in functional expression of an influenza virus hemagglutinin lacking the signal peptide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (12):3563-3567.
- Selleri M, Piralla A, Rozera G, Giombini E, Bartolini B, Abbate I, Campanini G, Rovida F, Dossena L, Capobianchi MR, Baldanti F. 2013. Detection of haemagglutinin D222 polymorphisms in influenza A(H1N1)pdm09-infected patients by ultra-deep pyrosequencing. *Clin Microbiol Infect*, 19 (7):668-673.
- Seyer R, Hrincius ER, Ritzel D, Abt M, Mellmann A, Marjuki H, Kuhn J, Wolff T, Ludwig S, Ehrhardt C. 2012. Synergistic adaptive mutations in the hemagglutinin and polymerase acidic protein lead to increased virulence of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus in mice. *J Infect Dis*, 205 (2):262-271.
- Shapiro GI, Gurney T, Jr., Krug RM. 1987. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol*, 61 (3):764-773.
- Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, Butler EN, Wallis TR, Klimov AI, Gubareva LV. 2008. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (9):3284-3292.

- Shi D, Yang J, Yang D, LeCluyse EL, Black C, You L, Akhlaghi F, Yan B. 2006. Anti-influenza prodrug oseltamivir is activated by carboxylesterase human carboxylesterase 1, and the activation is inhibited by antiplatelet agent clopidogrel. *J Pharmacol Exp Ther*, 319 (3):1477-1484.
- Shi M, Jagger BW, Wise HM, Digard P, Holmes EC, Taubenberger JK. 2012. Evolutionary conservation of the PA-X open reading frame in segment 3 of influenza A virus. *J Virol*, 86 (22):12411-12413.
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440 (7083):435-436.
- Sidwell RW, Bailey KW, Wong MH, Barnard DL, Smee DF. 2005. In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viramidine. *Antiviral Res*, 68 (1):10-17.
- Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. 1972. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*, 177 (4050):705-706.
- Sidwell RW, Huffman JH, Barnard DL, Bailey KW, Wong MH, Morrison A, Syndergaard T, Kim CU. 1998. Inhibition of influenza virus infections in mice by GS4104, an orally effective influenza virus neuraminidase inhibitor. *Antiviral Res*, 37 (2):107-120.
- Skehel JJ, Wiley DC. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69:531-569.
- Skehel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, Douglas AR, Knossow M, Wilson IA, Wiley DC. 1984. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (6):1779-1783.
- Smee DF, Wong MH, Bailey KW, Sidwell RW. 2006. Activities of oseltamivir and ribavirin used alone and in combination against infections in mice with recent isolates of influenza A (H1N1) and B viruses. *Antivir Chem Chemother*, 17 (4):185-192.
- Smee DF, Julander JG, Tarbet EB, Gross M, Nguyen J. 2012. Treatment of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus infections in mice with antiviral agents. *Antiviral Res*, 96 (1):13-20.
- Smee DF, Hurst BL, Wong MH, Bailey KW, Tarbet EB, Morrey JD, Furuta Y. 2010. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (1):126-133.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JS, Guan Y, Rambaut A. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459 (7250):1122-1125.
- Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. 1933. A virus obtained from influenza patients. *Lancet*, 222 (5732):66-68.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2006a. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg Infect Dis*, 12 (4):681-683.
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chutinimitkul S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. 2006b. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis*, 12 (11):1744-1747.
- Srinivasan A, Viswanathan K, Raman R, Chandrasekaran A, Raguram S, Tumpey TM, Sasisekharan V, Sasisekharan R. 2008. Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (8):2800-2805.
- Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. 2012. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 88 (6):226-249.

- Stech J, Xiong X, Scholtissek C, Webster RG. 1999. Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J Virol*, 73 (3):1878-1884.
- Stegmann T. 2000. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic*, 1 (8):598-604.
- Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122 (2):281-288.
- Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, Wilson IA. 2006. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*, 355 (5):1143-1155.
- Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J*, 11 (7):2407-2414.
- Storms AD, Gubareva LV, Su S, Wheeling JT, Okomo-Adhiambo M, Pan CY, Reisdorf E, St George K, Myers R, Wotton JT, Robinson S, Leader B, Thompson M, Shannon M, Klimov A, Fry AM, Resistance UA. 2012. Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus Infections, United States, 2010-11. *Emerg Infect Dis*, 18 (2):308-311.
- Strengell M, Ikonen N, Ziegler T, Julkunen I. 2011. Minor changes in the hemagglutinin of influenza A(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. *PLoS One*, 6 (10):e25848.
- Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 279 (5349):393-396.
- Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. 2012. Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. *PLoS One*, 7 (2):e32119.
- Takemae N, Ruttanapumma R, Parchariyanon S, Yoneyama S, Hayashi T, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Uchida Y, Kondo S, Yagi H, Kato K, Suzuki Y, Saito T. 2010. Alterations in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *J Gen Virol*, 91 (Pt 4):938-948.
- Tashiro M, McKimm-Breschkin JL, Saito T, Klimov A, Macken C, Zambon M, Hayden FG. 2009. Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antivir Ther*, 14 (6):751-761.
- Taubenberger JK, Morens DM. 2010. Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep*, 125 Suppl 3:16-26.
- Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. 1997. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science*, 275 (5307):1793-1796.
- Tisdale M. 2000. Monitoring of viral susceptibility: new challenges with the development of influenza NA inhibitors. *Rev Med Virol*, 10 (1):45-55.
- Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (11):4269-4274.
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 9 (10):e1003657.

- Topf D. 2010. Vergleichende Untersuchungen zur Pathogenität und Oseltamivirempfindlichkeit von A/swine/Potsdam/15/81 *in vivo* [Diplomarbeit]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Towatari T, Ide M, Ohba K, Chiba Y, Murakami M, Shiota M, Kawachi M, Yamada H, Kido H. 2002. Identification of ectopic anionic trypsin I in rat lungs potentiating pneumotropic virus infectivity and increased enzyme level after virus infection. *Eur J Biochem*, 269 (10):2613-2621.
- Tramontana AR, George B, Hurt AC, Doyle JS, Langan K, Reid AB, Harper JM, Thursky K, Worth LJ, Dwyer DE, Morrissey CO, Johnson PDR, Buising KL, Harrison SJ, Seymour JF, Ferguson PE, Wang B, Denholm JT, Cheng AC, Slavin M. 2010. Oseltamivir Resistance in Adult Oncology and Hematology Patients Infected with Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Australia. *Emerg Infect Dis*, 16 (7):1068-1075.
- Treanor JJ, El Sahly H, King J, Graham I, Izikson R, Kohberger R, Patriarca P, Cox M. 2011. Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok(R)) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*, 29 (44):7733-7739.
- Trebbien R, Larsen LE, Viuff BM. 2011. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Viol J*, 8:434.
- Triana-Baltzer GB, Gubareva LV, Klimov AI, Wurtman DF, Moss RB, Hedlund M, Larson JL, Belshe RB, Fang F. 2009. Inhibition of neuraminidase inhibitor-resistant influenza virus by DAS181, a novel sialidase fusion protein. *PLoS One*, 4 (11):e7838.
- Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, Glaser L, Solorzano A, Pappas C, Cox NJ, Swayne DE, Palese P, Katz JM, Garcia-Sastre A. 2007. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*, 315 (5812):655-659.
- Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, Nicholls JM, Chokephaibulkit K, Vanprapar N, Auewarakul P. 2005. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis*, 11 (7):1036-1041.
- Uraki R, Kiso M, Shinya K, Goto H, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Takahashi K, Daniels RS, Hungnes O, Watanabe T, Kawaoka Y. 2013. Virulence determinants of pandemic A(H1N1)2009 influenza virus in a mouse model. *J Virol*, 87 (4):2226-2233.
- Van Poucke SG, Nicholls JM, Nauwynck HJ, Van Reeth K. 2010. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Viol J*, 7:38.
- van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T. 2007. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol*, 171 (4):1215-1223.
- Vazquez-Perez JA, Isa P, Kobasa D, Ormsby CE, Ramirez-Gonzalez JE, Romero-Rodriguez DP, Ranadheera C, Li Y, Bastien N, Embury-Hyatt C, Gonzalez-Duran E, Barrera-Badillo G, Ablanado-Terrazas Y, Sevilla-Reyes EE, Escalera-Zamudio M, Cobian-Guemes AG, Lopez I, Ortiz-Alcantara J, Alpuche-Aranda C, Perez-Padilla JR, Reyes-Teran G. 2013. A (H1N1) pdm09 HA D222 variants associated with severity and mortality in patients during a second wave in Mexico. *Viol J*, 10:41.
- von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, Van Phan T, Smythe ML, White HF, Oliver SW, et al. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 363 (6428):418-423.
- Vu T, Farish S, Jenkins M, Kelly H. 2002. A meta-analysis of effectiveness of influenza vaccine in persons aged 65 years and over living in the community. *Vaccine*, 20 (13-14):1831-1836.
- Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. 2002. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol*, 12 (3):159-166.

- Wahlgren J. 2011. Influenza A viruses: an ecology review. *Infect Ecol Epidemiol*, 1.
- Wakelin LP, Adams A, Hunter C, Waring MJ. 1981. Interaction of crystal violet with nucleic acids. *Biochemistry*, 20 (20):5779-5787.
- Wang B, Dwyer DE, Soedjono M, Shi H, Matlho K, Ratnamohan M, Blyth C, McPhie K, Cunningham AL, Saksena NK. 2011. Evidence of the circulation of pandemic influenza (H1N1) 2009 with D222D/G/N/S hemagglutinin polymorphisms during the first wave of the 2009 influenza pandemic. *J Clin Virol*, 52 (4):304-306.
- Ward P, Small I, Smith J, Suter P, Dutkowski R. 2005. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother*, 55 Suppl 1:i5-i21.
- Wedde M, Wahlisch S, Wolff T, Schweiger B. 2013. Predominance of HA-222D/G polymorphism in influenza A(H1N1)pdm09 viruses associated with fatal and severe outcomes recently circulating in Germany. *PLoS One*, 8 (2):e57059.
- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 333 (6172):426-431.
- Whitley RJ, Boucher CA, Lina B, Nguyen-Van-Tam JS, Osterhaus A, Schutten M, Monto AS. 2013. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors, 2008-2011: the Influenza Resistance Information Study (IRIS). *Clin Infect Dis*, 56 (9):1197-1205.
- WHO World Health Organization. Influenza Fact sheet N°211 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
- WHO World Health Organization. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses, Revised February 2010 http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf?ua=1.
- WHO World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-2014 northern hemisphere influenza season http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201302_recommendation.pdf?ua=1.
- Wiley DC, Skehel JJ, Waterfield M. 1977. Evidence from studies with a cross-linking reagent that the haemagglutinin of influenza virus is a trimer. *Virology*, 79 (2):446-448.
- Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 289 (5796):366-373.
- Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P. 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, 83 (16):8021-8031.
- Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, Robb N, Schwartzman LM, Kash JC, Fodor E, Firth AE, Gog JR, Taubenberger JK, Digard P. 2012. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog*, 8 (11):e1002998.
- Witkowski JT, Robins RK, Sidwell RW, Simon LN. 1972. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *J Med Chem*, 15 (11):1150-1154.
- Woods JM, Bethell RC, Coates JA, Healy N, Hiscox SA, Pearson BA, Ryan DM, Ticehurst J, Tilling J, Walcott SM, et al. 1993. 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 37 (7):1473-1479.
- Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. 2007. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology*. 5. Aufl.

- Xu L, Bao L, Lv Q, Deng W, Ma Y, Li F, Zhan L, Zhu H, Ma C, Qin C. 2010. A single-amino-acid substitution in the HA protein changes the replication and pathogenicity of the 2009 pandemic A (H1N1) influenza viruses in vitro and in vivo. *Virol J*, 7:325.
- Xu R, Zhu X, McBride R, Nycholat CM, Yu W, Paulson JC, Wilson IA. 2012. Functional balance of the hemagglutinin and neuraminidase activities accompanies the emergence of the 2009 H1N1 influenza pandemic. *J Virol*, 86 (17):9221-9232.
- Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M, Tokumitsu A, Nasu H, Kubo S. 2009. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (1):186-192.
- Yang Y, Halloran ME, Sugimoto JD, Longini IM, Jr. 2007. Detecting human-to-human transmission of avian influenza A (H5N1). *Emerg Infect Dis*, 13 (9):1348-1353.
- Ye J, Sorrell EM, Cai Y, Shao H, Xu K, Pena L, Hickman D, Song H, Angel M, Medina RA, Manicassamy B, Garcia-Sastre A, Perez DR. 2010. Variations in the hemagglutinin of the 2009 H1N1 pandemic virus: potential for strains with altered virulence phenotype? *PLoS Pathog*, 6 (10):e1001145.
- Yen HL, Liang CH, Wu CY, Forrest HL, Ferguson A, Choy KT, Jones J, Wong DD, Cheung PP, Hsu CH, Li OT, Yuen KM, Chan RW, Poon LL, Chan MC, Nicholls JM, Krauss S, Wong CH, Guan Y, Webster RG, Webby RJ, Peiris M. 2011. Hemagglutinin-neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (34):14264-14269.
- Zarogiannis SG, Noah JW, Jurkuvenaite A, Steele C, Matalon S, Noah DL. 2012. Comparison of ribavirin and oseltamivir in reducing mortality and lung injury in mice infected with mouse adapted A/California/04/2009 (H1N1). *Life Sci*, 90 (11-12):440-445.
- Zell R, Scholtissek C, Ludwig S. 2013. Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 370:29-55.
- Zell R, Krumbholz A, Eitner A, Krieg R, Halbhuer KJ, Wutzler P. 2007. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol*, 88 (Pt 2):536-546.
- Zhang W, Shi Y, Qi J, Gao F, Li Q, Fan Z, Yan J, Gao GF. 2013. Molecular basis of the receptor binding specificity switch of the hemagglutinins from both the 1918 and 2009 pandemic influenza A viruses by a D225G substitution. *J Virol*, 87 (10):5949-5958.
- Zheng B, Chan KH, Zhang AJ, Zhou J, Chan CC, Poon VK, Zhang K, Leung VH, Jin DY, Woo PC, Chan JF, To KK, Chen H, Yuen KY. 2010. D225G mutation in hemagglutinin of pandemic influenza H1N1 (2009) virus enhances virulence in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235 (8):981-988.
- Ziegler T, Hemphill ML, Ziegler ML, Perez-Oronoz G, Klimov AI, Hampson AW, Regnery HL, Cox NJ. 1999. Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of influenza A viruses. *J Infect Dis*, 180 (4):935-939.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Influenza-A-Virions.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines HA-Trimers von IAV in der Ausgangskonformation.....	7
Abbildung 3: Übersicht über wichtige Domänen und strukturelle Veränderungen bei der HA-Spaltung und pH-abhängigen Freilegung des Fusionspeptids am Beispiel eines H1.....	8
Abbildung 4: Interaktion der Rezeptorbindestelle eines pandemischen H1N1 2009 IAV mit einem humanen Rezeptoranalogen.....	9
Abbildung 5: Ursprung und Zusammensetzung der Gensegmente eines A(H1N1)pdm09-Viruses.....	18
Abbildung 6: Chemische Struktur des natürlichen NA-Substrates und verschiedener NAI...20	
Abbildung 7: Vergleich der AS-Sequenz des HA-Vorläuferproteins von Jena/5258 bzw. mpJena/5258 (GenBank-Nummer KJ549778) und Potsdam/15 bzw. mpPotsdam/15.....	25
Abbildung 8: Vergleich der AS-Sequenz des NA-Proteins von Jena/5258 bzw. mpJena/5258 (GenBank-Nummer KJ549780) und Potsdam/15 bzw. mpPotsdam/15.....	26
Abbildung 9: Nachweis der IAV-spezifischen Oberflächenrezeptoren SA α 2,3Gal und SA α 2,6Gal auf MDCK- und MDBK-Zellen mittels Lektinfärbung.....	50
Abbildung 10: Replikation von mpJena/5258 und mpPotsdam/15 in MDCK- und MDBK-Zellen.....	50
Abbildung 11: Infektionsverlauf in mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen.....	55
Abbildung 12: Infektionsverlauf in mpPotsdam/15-infizierten BALB/c-Mäusen.....	56
Abbildung 13: Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante während der Infektion in der Lunge.....	59
Abbildung 14: Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante während der Infektion in der Trachea.....	60
Abbildung 15: Replikation von HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258 in MDCK- und MDBK-Zellen.....	63

Abbildung 16: Antikörpertiter in den Seren mpJena/5258-infizierter Mäuse gegen HA-D222-mpJena/5258 und HA-G222-mpJena/5258.....	65
Abbildung 17: Antikörpertiter in den Seren mpPotsdam/15-infizierter Mäuse gegen mpPotsdam/15.....	66
Abbildung 18: Einfluss der Oseltamivir-Behandlung (10 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf das Überleben, die Gewichtsänderung und den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^5 TCID ₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden.....	68
Abbildung 19: Einfluss der Dauer der Oseltamivir-Behandlung (100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 [d0 - 4] bzw. 7 Tage [d0 - 6], beginnend 4 h vor Infektion.) sowie einer Ribavirin-Behandlung (100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf das Überleben, die Gewichtsänderung und den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^6 TCID ₅₀ mpJena/5258 infiziert wurden.....	69
Abbildung 20: Einfluss der Oseltamivir- und Ribavirin-Behandlung auf die Lungenhistopathologie mpJena/5258-infizierter Mäuse am Tag 4 p. i.....	72
Abbildung 21: Einfluss der Oseltamivir-Behandlung (10 oder 100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) sowie einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf das Überleben, die Gewichtsänderung und den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^4 TCID ₅₀ mpPotsdam/15 infiziert wurden.....	75
Abbildung 22: Einfluss des Zeitraums der Oseltamivir-Behandlung (100 mg/kg/d, zweimal täglich, prophylaktisch über 7 Tage [d0 - 6], beginnend 4 h vor Infektion oder therapeutisch über 5 Tage [d2 -6], beginnend 2 d nach Infektion) sowie einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf das Überleben, die Gewichtsänderung und den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^4 TCID ₅₀ mpPotsdam/15 infiziert wurden.....	77
Abbildung 23: Einfluss der Oseltamivir- und Ribavirin-Behandlung auf die Lungenhistopathologie mpPotsdam/15-infizierter Mäuse am Tag 4 p. i.....	80
Abbildung 24: Einfluss einer Oseltamivir- (10 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) und einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf das	

Überleben, die Gewichtsänderung und den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^6 TCID ₅₀ HA-G222-mpJena/5258 infiziert wurden.....	83
Abbildung 25: Einfluss einer Oseltamivir- Behandlung mit verzögertem Behandlungsbeginn (100 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d2 - 6], beginnend 2 d nach Infektion) und einer Ribavirin-Behandlung (75 mg/kg/d, zweimal täglich, über 5 Tage [d0 - 4], beginnend 4 h vor Infektion) auf das Überleben, die Gewichtsänderung und den klinischen Score von BALB/c-Mäusen, die mit einer Virusdosis von 10^6 TCID ₅₀ HA-G222-mpJena/5258 infiziert wurden ...	85
Abbildung 26: Einfluss der Oseltamivir- und Ribavirin-Behandlung auf die Lungenhistopathologie HA-G222-mpJena/5258-infizierter Mäuse am Tag 4 p. i.....	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gegenüberstellung der für die Rezeptorbindung verantwortlichen AS und der <i>In vitro</i> - und <i>In vivo</i> -NAI-Empfindlichkeit von H1N1-Viren.....	24
Tabelle 2:	Chemikalien und Lösungsmittel.....	29
Tabelle 3:	Bewertungskriterien und zugeordneter klinischer Score zur Einschätzung des Allgemeinbefindens der Mäuse.....	37
Tabelle 4:	Anzahl der mpJena/5258-, mpPotsdam/15- und scheininfizierten Mäuse, die an den verschiedenen Versuchstagen zur Charakterisierung des Infektionsverlaufs seziiert wurden.....	38
Tabelle 5:	Übersicht der Tierversuche zur Untersuchung der Wirkung von Oseltamivir-Phosphat und Ribavirin in mpJena/5258-, HA-G222-mpJena/5258- und mpPotsdam/15-infizierten Mäusen.....	39
Tabelle 6:	Bewertungskriterien und zugeordneter histopathologischer Score für die Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Lungenschnitte.....	42
Tabelle 7:	Verwendete Primer.....	43
Tabelle 8:	Bindung und Elution von Hühner- und Schaferythrozyten durch die Ausgangsviren und die Maus-passagierten Viren.....	52
Tabelle 9:	NAI- und Ribavirin-Empfindlichkeit in einem Zell-basierten zpE-Hemmtest.....	53
Tabelle 10:	Zusammenfassung der <i>In vitro</i> -Eigenschaften von mpJena/5258 und mpPotsdam/15.....	53
Tabelle 11:	Anteil der HA-D222- und HA-G222-Variante in Lungen- und Tracheaprobe Jena/5258-infizierter Mäuse.....	61
Tabelle 12:	Bindung und Elution von Hühner- und Schaferythrozyten durch die HA-D222- und HA-G222-Variante.....	64
Tabelle 13:	Einfluss der antiviralen Behandlung auf die mittlere Überlebenszeit sowie das Lungengewicht, den Lungen- und Tracheatiter und den histopathologischen Score am Tag 4 p. i. von BALB/c-Mäusen, die mit verschiedenen Virusdosen von mpJena/5258 infiziert oder scheininfiziert wurden.....	71
Tabelle 14:	Zusammenfassung der antiviralen Wirkung von Oseltamivir und Ribavirin in mpJena/5258 infizierten BALB/c-Mäusen (10^5 und 10^6 TCID ₅₀).....	73
Tabelle 15:	Einfluss der antiviralen Behandlung auf die mittlere Überlebenszeit sowie das Lungengewicht, den Lungen- und Tracheatiter und den histopathologischen	

	Score am Tag 4 p. i. von BALB/c-Mäusen, die mit mpPotsdam/15 infiziert oder scheininfiziert wurden.....	79
Tabelle 16:	Zusammenfassung der antiviralen Wirkung von Oseltamivir und Ribavirin in mpPotsdam/15 infizierten BALB/c-Mäusen (10^4 TCID ₅₀).....	81
Tabelle 17:	NAI- und Ribavirin-Empfindlichkeit von HA-G222-mpJena/5258 in einem Enzym- und einem Zell-basierten Test.....	82
Tabelle 18:	Einfluss der antiviralen Behandlung auf die mittlere Überlebenszeit sowie das Lungengewicht, den Lungen- und Tracheatiter und den histopathologischen Score am Tag 4 p. i. von BALB/c-Mäusen, die mit HA-G222-mpJena/5258 infiziert oder scheininfiziert wurden.....	86
Tabelle 19:	Zusammenfassung der antiviralen Wirkung von Oseltamivir und Ribavirin in HA-G222-mpJena/5258-infizierten BALB/c-Mäusen (10^6 TCID ₅₀).....	88
Tabelle 20:	Vergleich von Untersuchungsparametern mpJena/5258-, HA-G222-mpJena/5258- und mpPotsdam/15-infizierter Mäuse.....	97
Tabelle 21:	Charakteristika und Anwendungsmöglichkeiten der Mausmodelle mit mpJena/5258, HA-G222-mpJena/5258 und mpPotsdam/15.....	113

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Michaela Schmidtke, die das Thema dieser Dissertation zur Verfügung gestellt hat. Ihre hervorragende, persönliche Betreuung, die anregenden, fachlichen Diskussionen sowie ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung bei den Tierversuchen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Wutzler, dem ehemaligen Leiter der Einrichtung, für die Übernahme der Zweitbetreuung bedanken.

Die Durchführung der zahlreichen Tierversuche war nur durch die tatkräftige Unterstützung meiner Kolleginnen Heike Braun, Martina Richter, Birgit Jahn, Birgit Meißner, Elisabeth Walther und Anja Hoffmann möglich, die auch für hilfreiche Diskussionen jederzeit zur Verfügung standen. Zusätzlich danke ich Birgit Meißner für die Anfertigung der histologischen Präparate. Der freundschaftliche Umgang innerhalb der gesamten Arbeitsgruppe Schmidtke sorgte für eine angenehme Zusammenarbeit und trotz schwierigsten Aufgaben und Problemen kam der Spaß bei der Arbeit nie zu kurz.

Dr. Michael Schacke danke ich für die Bereitstellung der Zellkulturen und Prof. Dr. Roland Zell für die Zurverfügungstellung der von ihm designten Primer. Daneben möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Zell, speziell bei Jeannette Lange und Martina Müller, für die Unterstützung bei der Sequenzierung und das ebenfalls freundschaftliche Verhältnis bedanken.

Weiterhin danke ich allen übrigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch meiner Familie und meinem Freund, die mich während der gesamten Promotionszeit auf jede nur erdenkliche Weise unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Michaela Schmidtke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gera, den 24.11.2014

.....
Nora Seidel

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nora Seidel
Geburtsdatum: 01. November 1987
Geburtsort: Lichtenstein (Sa.)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1994 - 07/1998: Grundschule Mülsen St. Niclas, Mülsen
08/1998 - 07/2002: Gymnasium „Am Sandberg“, Außenstelle Mülsen St. Micheln, Mülsen
08/2002 - 07/2006: Gymnasium „Am Sandberg“, Wilkau-Haßlau
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (01.07.2006)

Hochschulstudium

10/2006 - 03/2011: Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Diplom (30.03.2011)
Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung der Pathogenität und Neuraminidasehemmer-Empfindlichkeit von pandemischen Influenza-A (H1N1) 2009-Viren *in vitro* und *in vivo*
angefertigt am: Universitätsklinikum Jena, Institut für Virologie und Antivirale Therapie
04/2011 - 03/2014 Promotionsstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Thema der Dissertation: Bedeutung der Aminosäureposition 222 im Hämagglutinin für die Pathogenität und Neuraminidase-inhibitor-Empfindlichkeit von H1N1 Influenza-A-Viren

Berufliche Tätigkeit

seit 04/2011: wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Jena, Institut für Virologie und Antivirale Therapie

Gera, den 24.11.2014

.....

Nora Seidel

Wissenschaftliche Beiträge

Beiträge in Fachzeitschriften

Kirchmair J, Rollinger JM, Liedl KR, **Seidel N**, Krumbholz A, Schmidtke M. 2011. Novel Neuraminidase Inhibitors: identification, biological evaluation and investigations of the binding mode. *Future Med Chem*, 3:437-450.

Schade D, Kotthaus J, Riebling L, Kotthaus J, Müller-Fielitz H, Raasch W, Koch O, **Seidel N**, Schmidtke M, Clement B. 2014. Development of novel potent orally bioavailable oseltamivir derivatives active against resistant influenza A. *J Med Chem*, 57:759-769

Grienke U, Braun H, **Seidel N**, Kirchmair J, Richter M, Krumbholz A, von Grafenstein S, Liedl KR, Schmidtke M, Rollinger JM. 2014. Computer-Guided Approach to Access the Anti-influenza Activity of Licorice Constituents. *J Nat Prod*, 77:563-570

Manchanda H*, **Seidel N***, Krumbholz A, Sauerbrei A, Schmidtke M, Guthke R. 2014. Within-host influenza dynamics: A small-scale mathematical modeling approach. *Biosystems*, 118:51-59

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Seidel N, Sauerbrei A, Wutzler P, Schmidtke M. 2014. Hemagglutinin 222D/G polymorphism facilitates fast intra-host evolution of pandemic (H1N1) 2009 influenza A viruses. *PLoS One*, 9:e104233

Vorträge auf Fachtagungen

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Wutzler P, Schmidtke M. Standard oseltamivir treatment has no therapeutic effect on H1N1 influenza virus A/Jena/5258/09 infection in mice FluResearchNet Meeting, 26. - 27.09.2011, Braunschweig (Deutschland)

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Schmidtke M. Comparative study on the efficacy of antiinfluenzaviral compounds against pandemic H1N1 influenza virus (pH1N1) in mice 2. Infektionsmedizinisches Symposium Mitteldeutschland, 10.09.2012, Leipzig (Deutschland)

Braun H, Makarov VA, Riabova OB, Richter M, **Seidel N**, Sauerbrei A, Wutzler P, Schmidtke M. Therapeutic effect of an orally effective pyrazolo-pyrimidine derivative on coxsackievirus B3 (CVB3)-induced myocarditis in mice

23rd Annual Meeting of the Society for Virology, 06. - 09.03.2013, Kiel (Deutschland)

Seidel N, Bauer K, Lange J, Dürrwald R, Zell R, Sauerbrei A, Schmidtke M. Drug susceptibility of swine influenza A viruses isolated in Germany

Influenza 2013, 17. - 19.09.2013, Oxford (Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland)

Manchanda H, **Seidel N**, Schmidtke M, Guthke R. Mathematical modeling of a pandemic influenza A virus-induced disease in mice

Influenza 2013, 17. - 19.09.2013, Oxford (Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland)

Seidel N, Bauer K, Lange J, Dürrwald R, Zell R, Sauerbrei A, Schmidtke M. Drug susceptibility surveillance of swine influenza A viruses circulating in Germany - results of a six-year study

National Symposium on Zoonoses Research 2013, 19. - 20.09.2013, Berlin (Deutschland)

Manchanda H, **Seidel N**, Schmidtke M, Guthke R. Mathematical modelling of influenza A virus infection and antiviral therapy

2nd International Workshop Systems Biology of Microbial Infection, 19. - 20.09.2013, Jena (Deutschland)

Seidel N, Sauerbrei A, Wutzler P, Schmidtke M. Intra-host evolution of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus based on hemagglutinin 222D/G polymorphism

24th Annual Meeting of the Society for Virology, 26. - 29.03.2014, Alpbach (Österreich)

Seidel N, Bauer K, Lange J, Bohn K, Hoffmann A, Dürrwald R, Zell R, Sauerbrei A, Schmidtke M. Drug susceptibility of swine influenza A viruses isolated in Germany between 2003 and 2011

24th Annual Meeting of the Society for Virology, 26. - 29.03.2014, Alpbach (Österreich)

Posterpräsentationen

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Wutzler P, Schmidtke M. Oseltamivir-Susceptibility of 2009 H1N1 Pandemic Influenza A Viruses *in vitro* and *in vivo*

21st Annual Meeting of the Society for Virology, 23. - 26.03.2011, Freiburg (Deutschland)

Schmidtke M, Rollinger JM, Grienke U, **Seidel N**, Krumbholz A, Wutzler P, Liedl KR, Kirchmair J. Discovery of novel neuraminidase inhibitors (NAI) based on *in silico* screening and antiviral investigations

24th International Conference on Antiviral Research, 08. - 11.05.2011, Sofia (Bulgarien)

Kirchmair J, Rollinger JM, Grienke U, **Seidel N**, Krumbholz A, Wutzler P, Schmidtke M, Liedl KR. *In silico* identification of resistance-braking inhibitors of influenza neuraminidase
9th International Conference on Chemical Structures, 05. - 09.06.2011, Noordwijkerhout (Niederlande)

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Wutzler P, Schmidtke M. Higher drug concentrations are necessary for the use of oseltamivir as control compound in antiviral studies with pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses in mice

National Symposium on Zoonoses Research 2011, 06. - 07.10.2011, Berlin (Deutschland)

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Wutzler P, Schmidtke M. Characterization of the oseltamivir susceptibility of the pandemic H1N1 influenza virus A/Jena/5258/09 *in vitro* and *in vivo*

22nd Annual Meeting of the Society for Virology, 14. - 17.03.2012, Essen (Deutschland)

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Schmidtke M. Ribavirin but not oseltamivir should be used as control compound in efficacy studies of new anti-influenzaviral compounds against pandemic H1N1 influenza virus (pH1N1) in mice

3rd International Influenza Meeting, 02. - 04.09.2012, Münster (Deutschland)

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Schmidtke M. A pandemic H1N1 (pH1N1) G222 hemagglutinin (HA) genotype is not necessarily more pathogenic in mice than a D222 or E222 variant

National Symposium on Zoonoses Research 2012, 11. - 12.10.2012, Berlin (Deutschland)

Seidel N, Braun H, Richter M, Krumbholz A, Wutzler P, Sauerbrei A, Schmidtke M. A mouse model for antiviral efficacy studies with an unadapted H1N1 pandemic influenza A virus (pH1N1)

23rd Annual Meeting of the Society for Virology, 06. - 09.03.2013, Kiel (Deutschland)

Seidel N, Bauer K, Dürrwald R, Krumbholz A, Sauerbrei A, Schmidtke M. Establishment and characteristics of an antiviral mouse model with a swine influenza A virus

FluResearchNet Meeting, 26. - 27.09.2013, Münster (Deutschland)

Walther E, **Seidel N**, Xu Z, Sauerbrei A, Pfister A, Schmidtke M. Shared characteristic between viral and pneumococcal neuraminidases (NAs) and the influence of bacterial NA on viral replication

FluResearchNet Meeting, 26. - 27.09.2013, Münster (Deutschland)

Seidel N, Sauerbrei A, Wutzler P, Schmidtke M. Hemagglutinin 222D/G polymorphism of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses enables fast intra-host evolution and causes severe biphasic influenza in mice

5th ESWI Influenza Conference, 14. - 17.09.2014, Riga (Lettland)

Seidel N, Braun H, Richter M, Walther E, Hoffmann A, Wutzler P, Sauerbrei A, Schmidtke M. Ribavirin prevented severe influenza caused by intra-host evolution of pandemic H1N1 influenza A virus (A(H1N1)pdm09) mpJena/5258 with hemagglutinin 222D/G (HA-222D/G) polymorphism in mice

4th International Influenza Meeting, 21. - 23.09.2014, Münster (Deutschland)